

EINFLUSS VON MODIFIZIERTER
EXTRAZELLULÄRER MATRIX AUF DIE
PROTEINEXPRESSION VON FIBROBLASTEN

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

an der medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von:

Margarete Freiin von Feilitzsch

geboren am 03.06.1987 in Lüneburg

angefertigt an der medizinischen Fakultät der Universität Leipzig
Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und
Allergologie

Betreuer: PD Dr. rer. nat. habil. Ulf Anderegg

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 23.06.2015

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	I
Bibliographische Zusammenfassung	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1. Einleitung	1
1.1 Aufbau und Funktion der Haut.....	1
1.1.1 Epidermis	1
1.1.2 Dermis	2
1.1.3 Subkutis.....	3
1.1.4 Dermale Matrix	3
1.2 Wundheilung	6
1.2.1 Physiologische Wundheilung.....	6
1.2.2 Aufgabe der Fibroblasten in der Wundheilung.....	10
1.2.3 Pathologische Wundheilung	12
1.3 Biomaterialien	16
1.4 Fragestellung der Arbeit.....	19
2. Material und Methoden.....	21
2.1 Materialien	21
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	21
2.1.2 Chemikalien und Medien.....	23
2.1.3 Lösungen und Puffer	24
2.1.4 Antikörper	28
2.1.5 Verwendete Software.....	29
2.2 Matrixherstellung und Beschichtung der Zellkulturschalen	29
2.3 Methoden der Zellkultivierung.....	30
2.3.1 Isolierung von Fibroblasten aus humaner Haut	30
2.3.2 Passagieren von Zellkulturen	31
2.3.3 Zellen einfrieren und auftauen	31
2.3.4 Zellzählung mit einer Neubauer-Zählkammer.....	31
2.3.5 Aussäen der Zellen auf beschichteten Zellkulturschalen.....	32
2.4 Proteinbiochemische Methoden	32

2.4.1	Isolierung und Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	32
2.4.1.1	Einengen serumfreier Überstände.....	32
2.4.1.2	Gewinnung von Zelllysate.....	32
2.4.1.3	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	33
2.4.2	SDS–Gelelektrophorese und Western Blot.....	34
2.4.2.1	Probenvorbereitung.....	34
2.4.2.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).....	34
2.4.2.3	Western Blot	35
2.4.2.4	Immunodetektion von Proteinen.....	35
2.4.2.5	Membranstripping.....	36
2.4.3	Zymographie	37
2.5	Grafische Auswertung und Statistik.....	38
3.	Ergebnisse	40
3.1	Morphologie der kultivierten Fibroblasten	40
3.2	Kontrolluntersuchungen	41
3.2.1	Biologisches System	41
3.2.2	Methodik	42
3.2.3	Kontrolle der Versuchsbedingungen.....	43
3.3	Proteinexpression der Fibroblasten	45
3.3.1	Proteine des Matrixstoffwechsels	45
3.3.1.1	Matrixmetalloproteinasen	45
3.3.1.2	Kollagene	48
3.3.1.3	Thrombospondin-1.....	50
3.3.2	Proteine der Zell-Matrix-Interaktion und der Regulation der Proliferation.....	51
3.3.2.1	CD44	51
3.3.2.2	Ezrin.....	52
3.3.3	Proteine der Fibroblastendifferenzierung	53
3.3.3.1	Alpha-Smooth Muscle Actin	54
4.	Diskussion.....	55
4.1	Grundlage der Arbeit.....	55
4.2	Methodendiskussion.....	56
4.3	Einfluss der aEZM auf die Fibroblastenfunktion.....	59
5.	Zusammenfassung.....	71
	Literaturverzeichnis	VIII

Abbildungsverzeichnis.....	XXIII
Tabellenverzeichnis	XXIV
Publikation	XXV

BIBLIOGRAPHISCHE ZUSAMMENFASSUNG

Freiin von Feilitzsch, Margarete

Einfluss von modifizierter extrazellulärer Matrix auf die Proteinexpression von Fibroblasten

Medizinische Fakultät der Universität Leipzig, Dissertation

103 S., 159 Lit., 14 Abb., 5 Tabellen.

Referat: Der humanen dermalen Wundheilung liegt ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Faktoren zugrunde. Die Bedeutung dieses fein regulierten Gleichgewichts wird deutlich, wenn es durch Fehlregulationen oder Störungen zu chronischen Wundheilungsstörungen oder lokaler Fibrose mit überschießender Narbenbildung kommt. Eine der möglichen Methoden zur Prävention und Behandlung ist die Deckung der Wunde mit einem Hautersatz. Dabei werden zunehmend sogenannte Biomaterialien aus natürlichen Substanzen mit hoher Biokompatibilität und der Möglichkeit zur Interaktion mit dem nativen Gewebe verwendet. In Studien wurde gezeigt, dass vor allem sulfatierte Glykosaminoglykan-Derivate durch die Interaktion ihrer negativ geladenen Sulfatgruppen mit Zytokinen, Wachstumsfaktoren und dermalen Zellen einen positiven Einfluss auf den Wundheilungsprozess haben können. In der vorliegenden Arbeit wurden daher kollagenbasierte artifizielle extrazelluläre Matrices mit unsulfatierter oder sulfatierter Hyaluronsäure hinsichtlich ihres Einflusses auf humane dermale Fibroblasten als Komponenten der Wundheilung untersucht. Dermale Fibroblasten spielen im Ablauf der Wundheilung eine tragende Rolle und interagieren eng mit der umgebenden Matrix. Anhand ihrer Proteinexpression lassen sich Rückschlüsse auf wichtige Funktionen wie Adhäsion, Proliferation, Differenzierung und Matrixsynthese ziehen. In den durchgeführten Experimenten zeigte sich, dass sulfatierte Matrix in der Kultur mit dermalen Fibroblasten kein entzündliches Milieu förderte. Die Proliferation, Differenzierung und Migration der Fibroblasten schienen gesteigert, während sich die Matrix-Synthese und ihr Remodeling weder pathologisch gehemmt noch überschießend zeigten. Daher wäre die weitere Untersuchung dieses Biomaterials ein vielversprechender Ansatz, um langfristig dem Risiko von Wundheilungsstörungen wie chronischen Wunden oder fibroproliferativen Wundheilungsstörungen effektiv entgegenzuwirken.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
A	Österreich
Abb.	Abbildung
aEZM	artifizielle extrazelluläre Matrix
Aqua dest.	destiliertes Wasser
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CH	Schweiz
cm ²	Quadratzentimeter
D	Deutschland
d	Tage
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK-Signalweg	<i>extracellular signal-related kinase</i> -Signalweg
ERM-Familie	Ezrin-Radixin-Moesin-Familie
EZM	extrazelluläre Matrix
Fb	Fibroblasten
FKS	fetales Kälberserum
g	mittlere Erdschwerebeschleunigung
GAG	Glykosaminoglykan
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HA	<i>hyaluronic acid</i> (Hyaluronsäure)
HA3.0	sulfatierte Hyaluronsäure
HBSS	Hepes Puffer
HCl	Salzsäure
IL-1	Interleukin-1
kDa	Kilodalton
Koll	Kollagen

m ²	Quadratmeter
MFb	Myofibroblasten
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMP	Matrixmetalloproteinase
NaCl	Natriumchlorid
NL	Niederlande
nm	Nanometer
o. g.	oben genannt
p-Wert	<i>probability-value</i> (Signifikanzwert)
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PG	Proteoglykane
PGA	<i>polylactic-co-glycolic acid</i> (Polylaktat-glykolsäure)
pH	<i>potentia hydrogenii</i> (Wasserstoffstärke)
PLA	<i>polylactic acid</i> (Polylaktat)
PS	Polysterol
RFU	<i>relative fluorescence units</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
S	Schweden
SDS	Natriumdodecylsulfat
SILAC	<i>stable isotope labeling by/with amino acids in cell culture</i>
sog.	so genannt
TESS	<i>tissue engineered skin substitutes</i>
TGF-β ₁	<i>transforming growth factor-beta 1</i>
TIMP	<i>tissue inhibitors of metalloproteinases</i>
TNF-α	<i>tumor necrosis factor-alpha</i>
TSP-1	Thrombospondin-1
U	<i>units</i> (Enzymeinheiten)
u. a.	unter anderem
UK	Großbritannien

USA	Vereinigte Staaten von Amerika
V	Volt
v/v	<i>volume/volume</i> (volumenprozentige Lösung)
w/v	<i>weight/volume</i> (gewichtsprozentige Lösung)
z. B.	zum Beispiel
α -SMA	<i>alpha-Smooth Muscle Actin</i>
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

1. EINLEITUNG

1.1 AUFBAU UND FUNKTION DER HAUT

Die Haut ist das größte Organ des menschlichen Körpers und bildet beim erwachsenen Menschen ca. 1,4 – 2,0 Quadratmeter (m²) Körperoberfläche. Sie ist eine dynamische und protektive Grenzfläche und hat vielfältige aktive und passive Funktionen. Die Haut schützt den Körper vor physikalischen, chemischen und biologischen Umwelteinflüssen, reguliert die Körpertemperatur, dient als Wasser- und Energiespeicher und trägt als Sinnesorgan zur Kommunikation des Organismus mit der Umwelt bei (Sterry 2011; Aumüller 2007). Man teilt sie in die Leistenhaut an Hand- und Fußflächen sowie die Felderhaut ein, die mit ihren Drüsen und Haaren den Rest des Körpers bedeckt (Aumüller 2007).

1.1.1 EPIDERMIS

Die Epidermis ist die oberste Schicht der Haut und kann von 60 Mikrometer (µm) bis einige Millimeter (mm), an Schwielen sogar bis 5 mm dick sein. Mit > 90 % sind Keratinozyten die vorherrschenden Zellen dieser Hautschicht (Moll 2010). In einem proliferierenden und differenzierenden Stammzellsystem (Aumüller 2007) wandern die Keratinozyten durch die Epidermis, um schließlich im Sinne einer terminalen irreversiblen Differenzierung (Moll 2010) ein mehrschichtig verhorntes Plattenepithel zu bilden (Sterry 2011). Dieser als orthokeratotische Verhornung bezeichnete Prozess dauert circa (ca.) 4 Wochen (Moll 2010). Er beginnt im *Stratum basale*, das auch Proliferationskompartiment genannt wird, da sich die hier befindlichen Keratinozyten durch Mitose teilen (Moll 2010) und jeweils einer der beiden Klone durch Druck in Richtung Oberfläche getrieben wird. Diese zylindrischen Zellen sind noch komplett mit typischen Zellbestandteilen ausgestattet und über Zellfortsätze in der darunterliegenden Basalmembran verankert (Aumüller 2007).

Das darüber liegende *Stratum spinosum* besteht aus 2 – 6 Schichten von Keratinozyten, die sich von zylindrisch zu polygonal umformen, abflachen und mit der Keratinbildung beginnen, die zur Ausbildung von Tonofilamenten und in der Folge zur Bildung von Desmosomen führt. Dabei verfestigt sich der Zellverband zunehmend (Sterry 2011).

Im sich anschließenden 1 – 3 Schichten starken *Stratum granulosum* findet weiterhin Keratinsynthese statt. Die Zellen werden flacher und richten sich parallel zur

Oberfläche aus. Es wird nun Keratohyalin gebildet, das sich in Form von Keratohyalin-Granula dicht gepackt um die Tonofilamente anordnet. Mit Lipiden gefüllte Lamellen-Granula entstehen und es kommt zur Ausbildung von sogenannten (sog.) *Cornified Envelopes*, die als Hülle aus quervernetzten Proteinen später die Korneozyten des *Stratum corneum* umfassen (Aumüller 2007; Fritsch 2004).

Das *Stratum lucidum* schließt sich nur in der Leistenhaut, beziehungsweise (bzw.) in vielschichtigen Epithelien an das *Stratum granulosum* an (Aumüller 2007).

Schließlich befinden sich in der finalen Schicht der Epidermis, dem *Stratum corneum*, ca. 30 µm lange und 0,5 – 0,8 µm dicke kern- und organellenlose Hornzellen, die sog. Korneozyten. Sie bestehen hauptsächlich aus Keratinfilamenten, die aus Keratinen und Keratohyalinen aufgebaut und als polygonale Plättchen säulenartig angeordnet sind (Fritsch 2004; Sterry 2011). Außerdem sind Melanozyten (Melaninsynthese), Langerhans-Zellen als Teil des Immunsystems und Merkel-Zellen (Mechanorezeption) in die Epidermis eingebettet (Aumüller 2007).

1.1.2 DERMIS

Die Dermis besteht aus fibroelastischem Gewebe (Fritsch 2004), das zu 75 % aus Kollagen (Koll) besteht und für Elastizität und Flexibilität der Haut sorgt. Ihre oberste Schicht, das *Stratum papillare*, ist sägezahnartig aufgeworfen (Fritsch 2004) und verankert mit diesen Bindegewebspapillen und Reteleisten die Epidermis in der sog. dermoepidermalen Junktionszone fest in der Dermis (Sterry 2011). Dies sorgt für eine verbesserte Haftung und Reserve bei Dehnung des Gewebes und für die mechanische Stabilität der Haut (Fritsch 2004). In diese Verankerungsfibrillen ziehen kollagene Fasern ein. Außer den Fibroblasten (Fb), die den Hauptteil der extrazellulären Matrix (EZM) bilden (Fritsch 2004), befinden sich hier Kapillarschlingen, Lymphgefäße, Nervenendaufzweigungen, Zellen der Sinneswahrnehmung (Meissner-Tastkörperchen), Melanozyten und Immunzellen (Aumüller 2007; Moll 2010).

Die untere Schicht der Dermis wird, bedingt durch die hier liegenden starken kollagenen Faserbündel, *Stratum reticulare* genannt. Diese liegen in verschiedenen Winkeln zueinander und tragen zur Dehnbarkeit des Gewebes bei (Aumüller 2007). Außerdem sind Hautanhangsgebilde wie Haarfollikel, Schweiß- und Talgdrüsen in diese Schicht eingelagert (Aumüller 2007).

1.1.3 SUBKUTIS

Unter der Dermis liegt eine fettgewebsreiche Schicht, die Subkutis. Sie besteht aus Fettgewebe, das läppchenartig aufgebaut und durch bindegewebige Septen getrennt ist. Diese Septen stehen mit der Dermis in Verbindung und führen die Gefäß- und Nervenversorgung der Subkutis. Sie dient unter anderem (u. a.) als Kälteschutz und Energie- und Wasserspeicher (Fritsch 2004).

1.1.4 DERMAL MATRIX

Die Zellen der Dermis liegen eingebettet in eine extrazelluläre bindegewebige Matrix, die je nach Schicht und Bereich der Haut eine unterschiedliche Stärke und Festigkeit aufweist. Sie wird aus einem Netz miteinander verknüpfter Kollagenfasern gebildet, die in ein Gemisch aus Glykosaminoglykanen (GAG) und Proteoglykanen (PG) integriert sind (Fritsch 2004).

Die Proteine der EZM formen das strukturelle Gerüst aller Gewebe. Sie interagieren eng miteinander und bilden weite Netzwerke mit strukturellen und nicht-strukturellen Komponenten (Eckes et al. 2010). Die Kommunikation von Matrixbestandteilen und Zellen kommt durch direkte Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen oder durch die Modulation der Aktivität von Wachstumsfaktoren zustande (Eckes et al. 2010).

Der Hauptteil der EZM wird von Fb gebildet (Aumüller 2007). Sie synthetisieren sowohl Strukturproteine wie Koll, Elastin, Fibronectin und Laminin, als auch Matrixkomponenten wie GAG und PG (Fritsch 2004).

Das strukturegebende Faserprotein Kollagen ist ein wichtiger Bestandteil der EZM und kommt als extrazelluläres Stütz- und Strukturprotein in allen Organen des Körpers vor (Fritsch 2004). Es bildet den geformten, bzw. strukturellen Teil der Matrix. Bei den Kollagenen handelt es sich um eine Familie strukturverwandter Proteine (Fritsch 2004) mit insgesamt 28 bekannten Typen, die von mehr als 42 Genen kodiert werden (Eckes et al. 2010). Davon kommen 8 fibrilläre und netzbildende Typen in der Haut vor (Kadler et al. 2007). Vorherrschend sind dabei die quervernetzten Kollagenfasern von Koll I, die 80 – 90 % am Gesamtanteil ausmachen und Koll III mit ca. 8 – 12 %. Außerdem kommen Koll V (5 %) und das perlschnurartige Koll VI vor. Die gemeinsame Eigenschaft der Kollagene ist eine aus 3 linksgängigen α -Polypeptidketten mit regelmäßigem Aminosäuremuster bestehende Struktur (Fritsch 2004). Diese Ketten

sind über Wasserstoffbrücken zu einer rechtsgängigen Trippelhelix verbunden und werden als lösliche Prokollagene in den extrazellulären Raum sezerniert (Fritsch 2004). Dort werden Extensionspeptide entfernt und die Kollagene durch das Enzym Lysyloxidase quervernetzt. Es kommt zur Bildung von Fibrillen, welche sich zu Kollagenfasern bündeln und parallel in regelmäßigen Abständen miteinander verflochten sind (Fritsch 2004). Die strukturelle Organisation und supramolekulare Anordnung hängt jedoch von der jeweiligen Koll-Unterfamilie ab (Eckes et al. 2010). Entfaltetes oder denaturiertes Koll wird als Gelatine bezeichnet. Im Rahmen der Wundheilung, Embryogenese oder bei Entzündungen, Tumordinvasion oder -metastasierung wird Koll durch Zn^{2+} -abhängige Matrixmetalloproteinasen (MMP) abgebaut (Fritsch 2004), die u. a. von Fb gebildet werden. Vier verschiedene spezifische Inhibitoren, sog. *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMP), kontrollieren die Aktivität der MMP (Fritsch 2004).

Glykosaminoglykane und PG bilden den ungeformten/nicht-strukturellen Teil der dermalen Matrix (Aumüller 2007).

Glykosaminoglykane sind natürliche, negativ geladene, lineare Heteropolysaccharide, die aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten aufgebaut sind (Kunze et al. 2010). Sie haben eine hohe Bindungskapazität für Natriumionen, die ihrerseits Wassermoleküle binden und somit den Wassergehalt des Bindegewebes bestimmen (Aumüller 2007). Extrazelluläre GAG haben eine geringe Immunität und können Wachstumsfaktoren binden, konzentrieren, ihre Freisetzung kontrollieren und sie gegebenenfalls inaktivieren. Außerdem können GAG teilweise die Bindung der Wachstumsfaktoren an die jeweiligen Rezeptoren stabilisieren und sie vor dem proteolytischen Abbau schützen (Eckes et al. 2010; Hintze et al. 2009; Sasisekharan et al. 2006).

Die Protein-GAG-Wechselwirkungen entstehen durch ionische Interaktionen, vermittelt durch negative Ladungen der GAG durch ihre Sulfat- und Carboxylgruppen, die mit den basischen Aminosäuren der Proteine interagieren (Sasisekharan et al. 2006; Gandhi & Mancera 2008; Hynes 2009). Dabei ist sowohl der Grad als auch die Bindungsposition der Sulfatierung und der Carboxylgruppen von Bedeutung (Sasisekharan et al. 2006). Gama *et al.* zeigen Beweise für die Existenz eines *sulfation code* auf, der besagt, dass GAG durch die präzise Position der Sulfatgruppen an ihrem Kohlenhydrat-Rückgrat in der Lage sind Informationen zu verschlüsseln (Gama et al. 2006).

Eine Ausnahme der meist sulfatierten GAG ist die unsulfatierte Hyaluronsäure (HA). Sie ist ein lineares GAG aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten aus D-Glucuronsäure ($\beta 1 \rightarrow 3$) und N-Acetyl-D-Glucosamin ($\beta 1 \rightarrow 4$) (David-Raoudi et al. 2006) und kommt in den meisten lebenden Geweben als hochmolekulares Polymer vor (Toole 2004). Hyaluronsäure besteht aus bis zu 50.000 Disaccharideinheiten und erscheint durch seine hohe Wasserbindungskapazität wie ein nicht komprimierbares Gel (Aumüller 2007). Es hat eine Halbwertszeit von 3 Tagen und wird durch Isoformen des Enzyms Hyaluronidase abgebaut (Fritsch 2004).

Hyaluronsäure spielt eine entscheidende Rolle bei der Gewebereparatur im Rahmen der Wundheilung (Chen & Abatangelo 1999). Unter anderem moduliert es die Expression von Fb-Genen, die in den Umbau und die Reparatur der EZM involviert sind (David-Raoudi et al. 2006). Sie ist an der Angiogenese beteiligt und in dynamische Zellprozesse wie Zellmigration und Zell-Zell-Kontakte involviert (Chen & Abatangelo 1999). So treibt HA zum Beispiel (z. B.) frühe Entzündungen voran und schützt das bei der Wundheilung entstehende Granulationsgewebe vor Schäden durch Sauerstoffradikale (Chen & Abatangelo 1999). Dabei interagiert es mit der Zelloberfläche auf zwei Wegen. Einerseits bindet es an spezielle Oberflächenrezeptoren wie *cluster of differentiation 44* (CD44), *receptor for hyaluronic acid- mediated motility* (RHAMM) oder *lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor* (LYVE) (Clark et al. 2004; Jackson 2003; Toole 2001) und beeinflusst dadurch intrazelluläre Signalwege. Andererseits kann es auch permanent an die Zelloberfläche binden und durch die Interaktion mit ihrer Synthase daran fixiert werden (David-Raoudi et al. 2006).

Proteoglykane bilden die quantitativ bedeutendste und strukturell und funktional vielseitigste Gruppe der bindegewebigen, bzw. dermalen Grundsubstanz (Aumüller 2007). Sie bestehen aus einem Kernprotein und vielen O-glykosidisch gebundenen GAG (Clark et al. 2004). Ein typisches Beispiel ist Dekorin, das *transforming growth factor-beta 1* (TGF- β_1) in der Matrix binden und inaktivieren kann (Eckes et al. 2010).

Proteoglykane sorgen u. a. für eine hohe Toleranz gegen Druckbelastung. Sie sind integrierender Bestandteil der Basalmembranen und der Zelloberfläche (Fritsch 2004; Eckes et al. 2010) und fungieren als Wasserspeicher (Aumüller 2007; Eckes et al. 2010). Außerdem vermitteln sie Zell-Matrix-Interaktionen, vernetzen Bindegewebskomponenten und sorgen für ein Gleichgewicht im Wasser- und Salzhaushalt (Fritsch 2004; Eckes et al. 2010). Sie vermitteln die Differenzierung und

Adhäsion von Zellen (Milstone et al. 1994) und sind an der Wundheilung und Zellmigration beteiligt (Fritsch 2004). An Zelloberflächen gebundene PG können z. B. mit Integrinen zusammenwirken, um so intrazelluläre Signalwege zu aktivieren (Clark et al. 2004).

Zur ungeformten Matrix gehört des Weiteren das fibrilläre, unlösliche und elastische Protein Elastin (Fritsch 2004). Es befindet sich als Komponente des elastischen Gewebes in der Dermis und anderen Bindegeweben, ist aber kein Bestandteil des Granulationsgewebes während der Wundheilung (Eckes et al. 2010).

Außerdem besteht die EZM der Dermis aus adhäsiven Glykoproteinen. Diese Strukturproteine vernetzen die geformten und ungeformten Anteile der Matrix und verankern sie über Integrine an der Zellmembran (Aumüller 2007). Zu ihnen gehören u. a. Fibronektin und Laminin (Eckes et al. 2010).

Mit ihren vielfältigen Funktionen nimmt die EZM durch die Interaktion ihrer Komponenten mit Zellrezeptoren entscheidenden Einfluss auf die Wechselwirkungen der Zellen untereinander (Hynes 2009). Außerdem kommt es, u. a. im Rahmen der Wundheilung, zu einer ständigen Regeneration und Reorganisation der verschiedenen Bestandteile.

1.2 WUNDHEILUNG

1.2.1 PHYSIOLOGISCHE WUNDHEILUNG

Die Wundheilung bezeichnet die physiologischen Vorgänge zur Regeneration zerstörten Gewebes (Pschyrembel 2007). Dabei wird durch die Neubildung von Bindegewebe und Gefäßen ein Wundverschluss herbeigeführt (Pschyrembel 2007). Der Wundheilung liegt ein komplexes Zusammenspiel von zellulären und extrazellulären Mediatoren, Wachstumsfaktoren und Bestandteilen der EZM zugrunde. Das Ziel dabei ist das Erreichen eines zügigen Wundverschlusses, um die Besiedelung mit pathogenen Keimen zu vermeiden.

Heilung *per primam intentionem* findet statt, wenn die Wundränder eng aneinander liegen und dadurch die Phasen der Heilung schnell hintereinander ablaufen können. In diesem Fall ist lediglich eine geringe Gewebereparatur notwendig. Bei der Heilung *per secundam intentionem* befindet sich ein Gewebedefekt zwischen den weit auseinander

liegenden Wundrändern (Riede et al. 2004). Die Wundheilung läuft in drei sich überlappenden und nicht klar voneinander zu trennenden Phasen ab (siehe Abb. 1).

a. exsudative Phase (Entzündungs- oder Inflammationsphase)

In der exsudativen Phase kommt es nach einer initialen Ruptur von Blutgefäßen vorrangig zu einer primären Blutstillung (Hämostase) und einer physiologischen Entzündungsreaktion. Zunächst werden Fremdpartikel durch ein Wundsekret aus Blut und Lymphe aus der Wunde gespült. Dann bildet sich ein Fibrin-Blutgerinnsel, um das rupturierte Gefäß provisorisch zu verschließen (Clark 1985) und gleichzeitig eine provisorische Matrix für einwandernde Zellen herzustellen (Singer & Clark 1999). Der Fibrinpfropf dient auch zum Schutz vor eindringenden Mikroorganismen und als Reservoir für proinflammatorische und chemoattraktive Wachstumsfaktoren und Mediatoren. Durch sie werden verschiedene Zellen ins Wundgebiet gezogen (Singer & Clark 1999). Neutrophile Granulozyten und später Monozyten wandern ein und säubern die Wunde durch Phagozytose und Freisetzung proteolytischer Enzyme von Fremdkörpern. Aus Monozyten differenzierte Makrophagen exprimieren kontinuierlich Mediatoren wie TGF- β_1 , *transforming growth factor-alpha* (TGF- α), *basic fibroblast growth factor* (bFGF) und *platelet derived growth factor* (PDGF) (Eming et al. 2007), die u. a. die Bildung von Granulationsgewebe stimulieren.

b. proliferative Phase (Granulationsphase)

Die darauffolgende proliferative Phase wird durch zelluläre Proliferation und die Migration verschiedener Zelltypen ins Wundgebiet charakterisiert (Gurtner et al. 2008). Zunächst wandern randständige Keratinozyten von den Wundrändern über die verletzte Dermis, um durch anschließende Proliferation die Schutzfunktion des Epithels wiederherzustellen (Gurtner et al. 2008). Fibroblasten immigrieren in das Wundgebiet und werden u. a. durch von Makrophagen sezernierten Mediatoren zur Differenzierung zu Myofibroblasten (MFb) angeregt, die als kontraktile Zellen die Wundränder näher zueinander bringen (Gurtner et al. 2008) und eine hohe Matrix-Synthesekapazität haben. Sie synthetisieren u. a. Matrixkomponenten wie GAG, Fibronektin und Koll zur Auffüllung des Wunddefekts. Die proliferative Aktivität der Fb nimmt mit zunehmendem Kollagengehalt des neuen Gewebes ab. Gleichzeitig wird der anfängliche Fibrinschorf durch MMP abgebaut (Singer & Clark 1999). Neue Blutgefäße

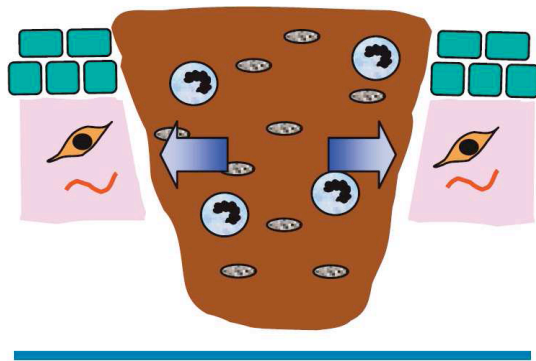
bilden sich am Wundrand und es entsteht ein stark durchblutetes Granulationsgewebe im Wundgebiet (Gurtner et al. 2008).

c. Regenerationsphase (Reparations- oder Epithelisationsphase)

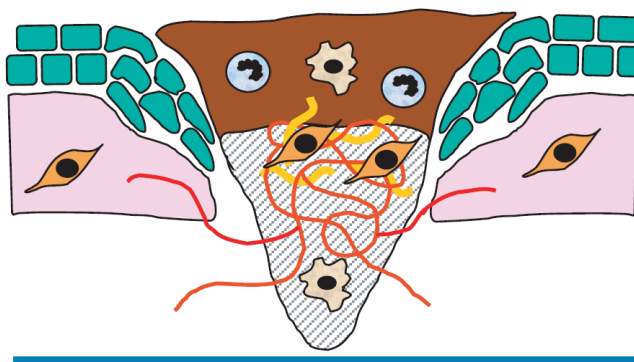
In der abschließenden Phase der Wundheilung kommt es zum Umbau des Granulationsgewebes in ein Narbengewebe mit begleitender Wundkontraktion (Singer & Clark 1999). Die vollständige epitheliale Wunddeckung erfolgt nun durch vom Wundrand einwandernde Keratinozyten. Die Kollagenfasern verfestigen und organisieren sich in dem aktiven proteolytischen System der MMP und TIMP um die neu gebildeten Kapillaren (Singer & Clark 1999). Das primäre Granulationsgewebe mit hohen Anteilen an Koll III und HA wird kontinuierlich in ein Koll I-reiches Narbengewebe mit zunehmender Festigkeit umgebaut (Gurtner et al. 2008). Allerdings erreicht das Gewebe nur ca. 70 % seiner ursprünglichen Stabilität (Singer & Clark 1999). Ein Großteil der im Laufe der Wundheilung aktivierten Epithel- und Immunzellen stellen ihre proliferative Aktivität ein und gehen in Apoptose über oder verlassen das Wundgebiet (Gurtner et al. 2008). Die Kapillaren bilden sich zurück und als Endpunkt der Wundheilung verbleibt ein zell- und gefäßarmes dichtes Narbengewebe (Gurtner et al. 2008; Singer & Clark 1999).

Bei der Heilung *per primam intentionem* entsteht eine strichförmige, kosmetisch unauffällige Narbe. Bei der Heilung *per secundam intentionem* hingegen bildet sich eine breite Narbe, die durch Schrumpfung auch zu Funktionseinschränkungen führen kann (Riede et al. 2004).

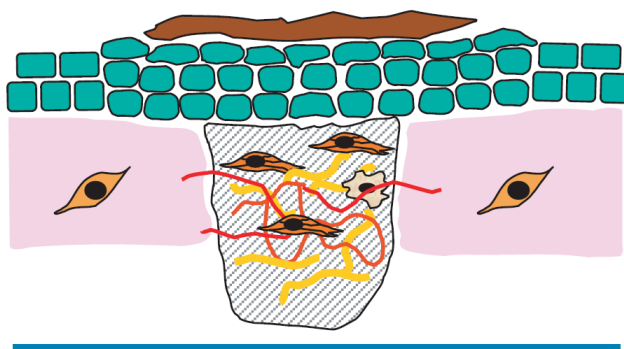
a



b



c

**LEGENDE**

	Keratinozyt
	Blutgefäss
	Dermis
	Fibroblast
	Thrombus
	Neutrophiler
	Thrombozyt
	Muskel
	Makrophage
	Wundmatrix
	Myofibroblast
	Granulations-gewebe

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Wundheilung

(modifiziert nach Werner & Grose 2003)

a) exsudative Phase (Entzündungs- oder Inflamationsphase)

b) proliferative Phase (Granulationsphase)

c) Regenerationsphase (Reparations- oder Epithelisationsphase)

1.2.2 AUFGABE DER FIBROBLASTEN IN DER WUNDHEILUNG

Fibroblasten sind spindelförmige, mit langen Fortsätzen ausgestattete Zellen mesenchymaler Herkunft, die neben anderen Gewebezellen wie Fibrozyten, Mastzellen, Lymphozyten, Leukozyten und Makrophagen in die EZM eingebettet sind. In der Dermis sind sie der vorherrschende Zelltyp. Neben der Produktion von unlöslichen Matrixkomponenten synthetisieren sie auch lösliche Faktoren wie Zytokine und Wachstumsfaktoren (Werner et al. 2007) und exprimieren membranständige Rezeptoren wie Adhäsionsproteine (Integrine), mit denen sie die biochemischen und physikalischen Eigenschaften der EZM wahrnehmen können (Eckes et al. 2010; Wipff et al. 2007). Durch diese Fähigkeiten können die Fb untereinander und mit der Matrixumgebung kommunizieren. Außerdem spielen sie zusammen mit Keratinozyten und Immunzellen eine Schlüsselrolle im komplizierten Wechselspiel der Wundheilung.

Fibroblasten sind neben Leukozyten und Endothelzellen die erste Zellpopulation, die in das Wundgebiet einwandert. Im Verlauf der Wundheilung können verschiedene Fb-Phänotypen charakterisiert werden. Zunächst (Tag 1-3) findet man proliferierende Fb, die von wandernden Fb abgelöst werden (Tag 4). Danach dominiert die Differenzierung zu MFb und die Matrixsynthese (ab Tag 7) bevor sie schließlich in Apoptose gehen (Grinnell 1994).

Im Nachfolgenden werden einige wichtige Fb-Funktionen ausführlicher dargestellt.

Zunächst ist ihre Beteiligung an der physiologischen Entzündungsreaktion während der Wundheilung zu nennen. Durch die Produktion verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren und ihren Einfluss auf die zelluläre Umgebung sind Fb in der Lage die Anreicherung, Differenzierung und das Überleben von Immunzellen im Wundgebiet zu regulieren und die Mikroumgebung im Gewebe zu beeinflussen (Parsonage et al. 2005; Buckley et al. 2001). So können sie beispielsweise durch die Expression des Adhäsionsmoleküls CD90 auf ihrer Oberfläche und andere, sekretierte Mediatoren das Migrationsverhalten von Neutrophilen steuern (Saalbach et al. 2008).

Der Verlauf der Wundheilung wird entscheidend durch Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen beeinflusst. Die Fb übernehmen auch hier eine entscheidende Rolle. Eine wichtige Interaktion ist ihr Zusammenspiel mit den Keratinozyten. So dominiert in den frühen Stadien der Wundheilung das von Keratinozyten produzierte Zytokin Interleukin-1 (IL-1), welches in Fb über *nuclear factor „kappa light chain enhancer“* of

activated B-cells (NfκB)-abhängige Signalwege die Synthese von Keratinozyten-Wachstumsfaktor (KGF), Interleukin-6 (IL-6), Endothelin-1 (ET-1), *epidermal growth factor* (EGF) und *granulocyte makrophage-colony stimulating factor* (GM-CSF) erhöht. Diese Zytokine stimulieren die Differenzierung und Proliferation der Keratinozyten, welche wiederum *tumor necrosis factor-alpha* (TNF-α) sezernieren, was zur vermehrten Proliferation von Fb führt (Werner et al. 2007).

Beide Zelltypen produzieren TGF-β₁, wodurch einerseits die epitheliale Regeneration durch die Keratinozyten angeregt wird, andererseits stimuliert TGF-β₁ die Differenzierung von Fb zu MFb (Shephard et al. 2004).

Eine weitere wichtige Funktion der Fb ist die Synthese und Reorganisation der EZM. Sie synthetisieren nach dem Abbau des initialen Fibrinpfropfes eine provisorische Matrix (Schreml et al. 2010) aus unreifem Koll III, GAG, PG, Fibrin und Fibronektin, in die sich die Gewebezellen selbst einbetten (Greiling & Clark 1997). Dieses Granulationsgewebe wird nachfolgend kontinuierlich in ein Narbengewebe umgebaut. Fibroblasten sind dabei an der Neusynthese und dem Abbau von EZM-Komponenten durch die Expression von proteolytischen MMP beteiligt (Singer & Clark 1999). Durch den Ersatz von Koll III mit von Fb produziertem Koll I gewinnt das Gewebe zunehmend an Festigkeit (Gurtner et al. 2008).

Die Fb stehen über Integrine mit der umliegenden Matrix in Verbindung (Eckes et al. 2006). Dadurch kann die Beschaffenheit der Matrix den Phänotyp und die Funktion der Fb beeinflussen (Grinnell 1994). Die durch den Umbau in Narbengewebe entstehende mechanische Spannung führt zusammen mit TGF-β₁ und der spezifischen Fibronektin Splice-Variante ED-A über die Zwischenstufe Proto-MFb zur Differenzierung einiger Fb in MFb (Gabbiani 2003; Hinz 2007). Dieser spezielle Fb-Phänotyp besitzt intrazelluläre Mikrofilamente und wird u. a. durch die Expression des prokontraktilen Proteins *alpha-Smooth Muscle Actin* (α-SMA) charakterisiert (Darby et al. 1990). Myofibroblasten zeichnen sich durch ihren aktivierten und Matrix-produzierenden Phänotyp (Eckes et al. 2006) und ihre kontraktilen Fähigkeiten aus und können durch das Zusammenbringen der Wundränder die ursprüngliche Wundfläche um bis zu 50 % verringern (Hinz 2007).

1.2.3 PATHOLOGISCHE WUNDHEILUNG

Der Ablauf der Wundheilung wird durch ein kompliziertes Zusammenspiel verschiedener Faktoren bestimmt. Die Bedeutung dieses fein regulierten Gleichgewichts wird deutlich, wenn es durch Fehlregulationen und Störungen statt des physiologischen Ablaufs zu einer chronischen Wundheilungsstörung oder einer lokalen Fibrose mit überschießender Narbenbildung kommt. Während chronische Wunden durch eine defiziente Wundheilung mit verspätetem oder fehlendem Wundverschluss charakterisiert werden, zeigt eine fibrotische Wundheilung eine massive Anhäufung von kollagenem Narbengewebe und eine „zu effektive“ Wundheilung (Toriseva & Kähäri 2009).

Eine Wunde wird als „chronisch“ bezeichnet, wenn sie trotz adäquater Behandlung durch verzögerten, insuffizienten oder fehlenden Wundschluss länger als 4 Wochen besteht (Coerper et al. 1999). Zu den häufigsten chronischen Wunden wird das *Ulcus cruris venosum* durch chronisch venöse Insuffizienz, das Dekubitalulkus und das diabetische Ulkus, welches meistens am Fuss lokalisiert ist, gezählt (Harding et al. 2005). Die Ursachen für die Entstehung solcher Krankheitsbilder werden nach Cohen *et al.* in systemische (extrinsische) und lokale (intrinsische) Faktoren eingeteilt (Cohen et al. 1992). Zu den systemischen Faktoren zählen z. B. das Lebensalter des Patienten, Mangelernährung, Begleiterkrankungen wie Diabetes mellitus, während bei den lokalen Faktoren die Ischämie und die Infektion im Vordergrund stehen. Die Pathogenese chronischer Wunden ist komplex und multifaktoriell, trotzdem zeigen diese ein weitgehend einheitliches pathophysiologisches Muster mit Hauptcharakteristika wie pathologischer Entzündung, Alterung der Fb und unkontrollierter Proteolyse (Menke et al. 2007). Die oben genannten (o. g.) Faktoren führen im ohnehin fragilen Wundgebiet zu einer Schädigung der Gefäßwände durch hydrostatischen Druck, Verletzungen und/oder bakterielle Besiedelung. Durch inflammatorische Moleküle der Bakterien, Thrombozytenprodukte wie TGF- β_1 oder partielle Degradationsprodukte der EZM-Moleküle (z. B. Fibronectin) kommt es zu einer massiven Einwanderung von Entzündungszellen ins Wundgebiet (Diegelmann & Evans 2004). Diese aktiven Entzündungszellen wiederum sezernieren proinflammatorische Zytokine (u.a. TNF- α , IL-1 und TGF- β_1). Sie persistieren während des ganzen Wundheilungsprozesses in der Wunde (Diegelmann 2003) und verändern das Proteasen- und Zytokinprofil. Es kommt zur Freisetzung großer Mengen verschiedener Proteasen und dadurch u. a. zu einer

Imbalance zwischen degradierenden MMP und TIMP (Bullen et al. 1995; Toriseva & Kähäri 2009). So sind beispielsweise MMP-1 in Fb und Keratinozyten und MMP-2, -3, -9, -10 und MMP-11 in Fb erhöht (Yager & Nwomeh 1999). Lobmann *et al.* zeigten, dass höhere Mengen an MMP-1, -2, -8 und -9 und geringere Mengen von TIMP-2 in diabetischen Fußulzera im Gegensatz zu traumatischen Wunden gefunden wurden (Lobmann et al. 2002). Außerdem wurde in chronischen Wunden die erhöhte Produktion von MMP-8 durch Neutrophile beschrieben (Nwomeh et al. 1999). Diese Proteasen bauen mehr EZM ab als durch die Fb im Wundgebiet aufgebaut werden kann. Es kommt zu einer Veränderung der Struktur und Zellsignale der EZM und dadurch z. B. zu einer verminderten Fähigkeit der Keratinozyten zur Migration über das Wundbett und in Folge zur verzögerten Epithelisierung (Agren & Werthén 2007). Ein Faktor dafür kann der Mangel an Fibronectin sein, durch den die zelluläre Migration und Proliferation gehemmt ist (Agren & Werthén 2007). Auch die Spaltprodukte aus dem exzessiven Abbau von EZM-Komponenten wie Fibronectin, Koll und Vitronectin (Bullen et al. 1995) begünstigen, u. a. durch die Freisetzung von MMP, das Aufrechterhalten der Entzündung (Diegelmann 2003; Agren & Werthén 2007).

Gleichzeitig ist die Matrixsynthesekapazität ohnehin verlangsamt, da Fb aus chronischen Wunden im Gegensatz zu Fb aus akuten Wunden eine frühe Alterung zeigen, welche die normale Funktion beeinträchtigt (Menke et al. 2007). Sie zeigen unabhängig vom Alter des Patienten Merkmale der Seneszenz (Schreml et al. 2010), wie z. B. eine reduzierte Migrations- und Proliferationskapazität und eine geringere Antwort auf Wachstumsfaktoren (Menke et al. 2007; Schreml et al. 2010). West *et al.* konnten zeigen, dass ausgereifere Fb mehr MMP und weniger TIMP synthetisieren (West et al. 1989). Sie sind zudem anfälliger für hypoxische Zustände (Schreml et al. 2010). Die Veränderungen der Fb könnte sich laut Schreml *et al.* zum einen aus der Dauerstimulation mit Zytokinen und reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS (*reactive oxygen species*)), andererseits aus den häufigen Zellteilungen, die sie zur Förderung der Wundheilung eingehen, ergeben (Schreml et al. 2010). Ab einem Anteil seneszenten Fb von über 15 % an der Gesamt-Fb-Zahl kann davon ausgegangen werden, dass sich die Wundheilung deutlich verzögert (Agren & Werthén 2007).

Matrixmetalloproteinasen und andere Proteasen wie Elastase bauen Wachstumsfaktoren (z. B. PDGF und TGF- β_1) (Yager et al. 1996) und ihre Rezeptoren ab, wodurch es zu einem veränderten Zytokinprofil im Wundsekret kommt (Menke et al. 2007).

Maßgeblich entsteht eine Dominanz der proinflammatorischen Zytokine wie TNF- α (Mast & Schultz 1996) gegenüber Zytokinen, welche die zelluläre Proliferation (z. B. PDGF) oder die Matrixreorganisation (z. B. TGF- β_1) begünstigen (Cooper et al. 1994).

Die Zufuhr von Sauerstoff spielt eine wichtige Rolle in der Wundheilung. Bei den o. g. Ursachen chronischer Wunden wie Mikroangiopathie bei Diabetes mellitus oder bei Ödemen kommt es durch eine mangelhafte Blut- und damit Sauerstoffversorgung im Wundgebiet zu hypoxischen Zuständen. Gleichzeitig werden durch die eingewanderten Neutrophilen und Makrophagen ROS produziert, die in der akuten Wundheilung zum Schutz vor Mikroorganismen essentiell notwendig sind (Schreml et al. 2010). Kann jedoch das Gleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidanten durch den Mangel an Sauerstoff nicht mehr aufrechterhalten werden, kommt es zur Schädigung von Desoxyribonukleinsäure (DNS) und extrazellulären Strukturen wie Lipiden und einer erhöhten Produktion von MMP, Serinproteasen und inflammatorischen Zytokinen (Schreml et al. 2010). Unter hypoxischen Bedingungen kann zudem weniger Kollagen synthetisiert werden (Schreml et al. 2010).

Alle genannten pathophysiologischen Faktoren sprechen für eine Arretierung der Wundheilung in der Phase der Entzündung, die im Gegensatz zur akuten Wunde nicht selbst-limitierend ist und sich in einem *circulus vitiosus* selbst weiter aufrecht erhält.

Ein weiteres Beispiel pathologischer Wundheilung sind lokale Fibrosen, die sich in der Bildung von hypertrophen Narben oder Keloiden manifestieren. Bei beiden Formen kommt es zu einer massiven Anhäufung von deformiertem, unfunktionalem kollagenen Narbengewebe und zu einem reduzierten Matrix-Umbau (Diegelmann & Evans 2004). Durch den resultierenden Elastizitätsverlust kann es zu Komplikationen wie Kontrakturen oder -im schlimmsten Fall- funktionaler Behinderung kommen (Toriseva & Kähäri 2009). Die Risikofaktoren für die Entstehung lokaler Fibrosen sind großflächige, tiefe Wunden, ein verzögerter Wundverschluss und Spannung durch großen Gewebeverlust oder eine mechanische Beanspruchung der Wunde (Toriseva & Kähäri 2009). Allerdings sind die genauen molekularen Mechanismen, die dann zur Bildung von hypertrophen Narben oder Keloiden führen, noch immer unklar (Toriseva & Kähäri 2009).

Hypertrophe Narben sind derbe, über das Hautniveau erhobene Narben, die im Gegensatz zu Keloiden häufiger auftreten und typischerweise nicht die Grenzen des

originären Wundgebiets überschreiten (Toriseva & Kähäri 2009; Aarabi et al. 2007; Ehrlich et al. 1994). Sie haben, anders als Keloide, typischerweise keinen genetischen Hintergrund, bilden sich im Laufe der Zeit zurück, können chirurgisch revidiert werden (Ehrlich et al. 1994; Toriseva & Kähäri 2009) und sind abhängig von der Tiefe der Wunde (Ehrlich et al. 1994).

Mikroskopisch betrachtet haben hypertrophe Narben eine noduläre Struktur, in die Fb, kleine Gefäße und feine, wahllos organisierte Kollagenfasern eingelagert sind (Ehrlich et al. 1994). Nur diese nodulären Strukturen enthalten α -SMA exprimierende MFb (Ehrlich et al. 1994). Keloide dagegen bestehen aus großen, dicken Kollagenfasern aus vielen dicht gepackten Fibrillen und amorpher EZM, welche die Fb umgeben (Ehrlich et al. 1994). In der Zellkultur findet man hingegen keinen Unterschied der Expression von α -SMA durch MFb aus Keloiden oder hypertrophen Narben, welches laut Ehrlich *et al.* auf einen Einfluss der lokalen Mikroumgebung im Gewebe auf die Proteinexpression durch die MFb schließen lässt (Ehrlich et al. 1994). Eine Zusammenfassung der Merkmale hypertropher Narben und Keloiden zeigt Tabelle 1.

Pathophysiologisch zeigen diese beiden Formen der lokalen Fibrose grundlegend eine aktive proliferative Phase (Singer & Clark 1999). Es lassen sich jedoch gewisse biochemische und zelluläre Unterschiede zu physiologischen Narben identifizieren. Tredget *et al.* beschrieben Unterschiede in der Zellmigration und –proliferation, der Entzündung, der Synthese und Sekretion der EZM-Proteine und -Zytokine und im Aufbau der Wundmatrix (Tredget et al. 1997).

Auch bei fibrotischen Wundheilungsstörungen wurde eine veränderte Proteasen-Zusammensetzung gefunden. In Keloid-Fb sind z. B. sowohl MMP-1, als auch MMP-2 und TIMP-2 hochreguliert (Fujiwara et al. 2005). Nicht zuletzt werden veränderten epidermal-mesenchymalen Interaktionen und Mutationen in regulatorischen Genen (z. B. p53) eine wesentliche Rolle bei der Pathogenese von hypertrophen Narben und Keloiden zugewiesen (Ladin et al. 1998; Machesney et al. 1998).

Die komplexe Pathophysiologie von Wundheilungsstörungen spiegelt sich auch in der Vielseitigkeit ihrer Behandlung wieder. So reichen die Behandlungsstrategien über das chirurgische oder enzymatische Debridement, Folien, Hydrokolloidverbände, bis zu aktiven oder inaktiven Wundauflagen und Hydrogelen. Außerdem kommen

antibiotische lokale oder systemische Therapeutika sowie Antiseptika zum Einsatz (Gillitzer 2002).

Tabelle 1: Vergleich der Merkmale von hypertrophen Narben und Keloiden

	<i>Hypertrophe Narbe</i>	<i>Keloid</i>
Allgemein	<ul style="list-style-type: none"> • ohne genetischen Hintergrund • bildet sich im Laufe der Zeit zurück • kann chirurgisch revidiert werden 	<ul style="list-style-type: none"> • mit genetischem Hintergrund • bildet sich typischerweise nicht zurück • kann typischerweise chirurgisch nicht revidiert werden
Makroskopische Morphologie	<ul style="list-style-type: none"> • derbe, über das Hautniveau erhabene Narbe • überschreitet nicht die Grenzen des originären Wundgebiets • abhängig von der Tiefe der Wunde 	<ul style="list-style-type: none"> • überschreitet die Grenzen des originären Wundgebiet • nicht abhängig von der Tiefe der Wunde
Mikroskopische Morphologie	<ul style="list-style-type: none"> • noduläre Struktur, in die Fb, kleine Gefäße und Koll eingelagert sind 	<ul style="list-style-type: none"> • Fb sind umgeben von Kollagenfasern und amorpher EZM
Kollagenstruktur	<ul style="list-style-type: none"> • feine, wahllos organisierte Kollagenfasern 	<ul style="list-style-type: none"> • große, dicke Kollagenfasern aus vielen dicht gepackten Fibrillen
Fb-Phänotyp	<ul style="list-style-type: none"> • α-SMA-exprimierende MFb in vivo 	<ul style="list-style-type: none"> • keine Expression von α-SMA in vivo

1.3 BIOMATERIALIEN

Eine der vielfältigen Methoden zur Behandlung akuter und chronischer Wunden ist die Deckung der Wunde mit einem Hautersatz. Die Alternative der regenerativen Medizin zu bisherigen, teilweise unzulänglichen Vorbeugungs- und Behandlungsoptionen von chronischen Wunden und lokalen Fibrosen sind biotechnologisch hergestellte Hautersatzmaterialien, sog. *tissue engineered skin substitutes* (TESS). Es werden im Allgemeinen drei grundlegende Typen des Hautersatzes differenziert, die sowohl

azellulär als auch zellulär sein können: epidermale Sheets, Dermisersatz und Kompositransplantate (Berger & Hierner 2003).

Die Ansprüche an TESS sind hoch: Sie sollen nicht nur den Hautdefekt decken und die Form und Funktionalität des Gewebes wiederherstellen, sondern auch klinisch unkompliziert und schnell anwendbar sein (Clark et al. 2007; Dieckmann et al. 2010) und ein ästhetisches Ergebnis erzielen. Außerdem sollen sie die Schmerzen und den Diskomfort für den Patienten erheblich lindern und den Regenerationsprozess des Gewebes ohne Entzündung oder Abstoßung auslösen und fördern (Dieckmann et al. 2010). Nicht zuletzt ist auch die Kosteneffektivität von Bedeutung (Metcalf & Ferguson 2007). Pham *et al.* geben eine detaillierte Darstellung der vielfältigen Verfahren und Möglichkeiten des Hautersatzes (Pham et al. 2007).

In der Entwicklung und Herstellung von Dermisersatz wurde und wird auf sog. Biomaterialien zurückgegriffen. Dies sind azelluläre natürliche oder synthetische biodegradierbare Stoffe, die als Grundgerüst für die Herstellung eines Hautersatzmaterials dienen (Dieckmann et al. 2010). Williams definierte Biomaterialien im Allgemeinen als technisch hergestellte Stoffe, die durch ihre bestimmte Form, alleine oder als Teil eines komplexen Systems, unter Berücksichtigung und dem Einfluss der Interaktionen in einem lebenden System, den Ablauf jeder therapeutischen oder diagnostischen Prozedur modulieren können (Williams 2009).

Das Grundprinzip der Herstellung von Biomaterialien zur Deckung von Hautwunden ist die Komposition eines dreidimensionalen Netzwerks aus synthetischen oder natürlichen Substanzen, in welches die körpereigenen Zellen einwandern und das Gewebe regenerieren können. Bereits klinisch angewandte TESS werden ausführlich von Metcalf *et al.* dargestellt (Metcalf & Ferguson 2007).

Zu den synthetischen, voll biodegradierbaren Materialien gehören Polylaktat (PLA), Polylaktat-glykolsäure (PGA) oder Polyethylenglycol-Polybutylenterephthalaten (PEGT/PBT) sowie Polycaprolacton (PCL) (Zhong et al. 2010). Ein schon in der Klinik bei diabetischen Fußulzera angewandtes Produkt ist Dermagraft[®], das aus einem Netz aus PGA und PLA-Polymeren besteht, welches mit humanen Fb kultiviert wurde (Marston 2004). Diese synthetischen Stoffe sind weniger kostenintensiv als natürliche Materialien und aufgrund ihrer standardisierten Herstellung zuverlässig und mit reproduzierbarer Qualität verfügbar (Zhong et al. 2010). Allerdings ist ihre mangelnde

Gewebekompatibilität und das Fehlen von biologischen Signalen (Vacik et al. 2008), um Vorgänge wie Zelladhäsion, -proliferation und -differenzierung zu stimulieren, (Zhong et al. 2010) ein großer Nachteil.

Als natürliche Materialien werden u. a. Polypeptide, GAG, Fibronectin, Koll, Chitosan und Alginat verwendet (Metcalf & Ferguson 2007). Ihre Vorteile sind im Allgemeinen die geringe Toxizität und das seltene Auftreten einer chronischen Entzündung (Metcalf & Ferguson 2007). Andererseits besteht bei den oft xenogenen Substanzen das Risiko der Übertragung von tierischen Viren (Clark et al. 2007). So wird beispielsweise Rinderkollagen (Integra[®], Matriderm[®]) und Schweinekollagen (Oasis[®], Biobrane[®]) bevorzugt eingesetzt.

Ein weiterer Dermisersatz, bei dem jedoch nicht die Gefahr der Virusübertragung besteht, ist die allogene Kadaverhaut. Sie ermöglicht allerdings durch Abstoßungsreaktionen nur eine temporäre Deckung (Clark et al. 2007). Eine modifizierte, nicht immunogene Variante der Kadaverhaut ist Alloderm[®], die allein oder in Kombination mit kultivierten autologen Keratinozyten für Verbrennungs- oder chronische Wunden verwendet wird (Cuono et al. 1986).

Ein weiterer Vorteil des Einsatzes natürlicher Materialien ist, abgesehen von der Biokompatibilität, die Interaktion der Substanzen mit dem nativen Gewebe. Neuere Forschungserkenntnisse über die Abläufe der Wundheilung zeigen zunehmend die Bedeutung der räumlich-zeitlichen Verteilung von Mediatoren wie Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Chemokinen für die regelrechte Regeneration von Geweben. Wie bereits dargestellt, verfügen insbesondere GAG und deren Derivate neben ihren direkten Interaktionen mit dem nativen Gewebe über die Fähigkeit Mediatoren zu binden, zu aktivieren und ihre biologische Aktivität zu modulieren (Eckes et al. 2010; Hintze et al. 2009; Sasisekharan et al. 2006). Daher rücken diese Eigenschaften der natürlichen EZM und deren Derivate mehr in das Zentrum der modernen Biomaterialforschung. Beispielsweise wurden dreidimensionale Koll/Chondroitin-Gerüsten (*Scaffolds*) bereits *in vivo* als Hautersatz bei großflächigen Gesichtsverbrennungen und chronischen, schlecht heilenden Wunden eingesetzt (Integra[®], Oasis[®]) (Fette 2005; Niezgoda et al. 2005). Auch andere GAG wie HA oder Chondroitinsulfat kamen erfolgreich in präklinischen Wundheilungsmodellen bzw. in klinischen Studien zum Einsatz (Kirker et al. 2002; Kirker et al. 2004; Gurtner et al. 2008).

Trotz neuer Erkenntnisse über die Abläufe der Wundheilung einerseits und der Entwicklung neuer Hautersatzmaterialien und Wunddeckungsverfahren andererseits, ist es notwendig, neue, auf der Rolle der EZM, der Fb und der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen basierende Hautersatzmaterialien zu entwickeln, die die natürliche EZM imitieren und auf dem Einsatz von biodegradierbaren natürlichen Materialien fundieren. Da die Gewebezellen selbst die primäre Quelle vieler Moleküle der EZM sind, die wichtige Rollen in der Koordination und dem Ablauf der Wundheilung haben, müssen TESS in der Lage sein, durch direkte Interaktionen mit Zellen (u. a. Fb) und insbesondere Signalmolekülen schnell Gewebezellen zu rekrutieren und sie zu Migration, Proliferation, Synthese und Differenzierung anzuregen (Clark et al. 2007; van der Smitten et al. 2011).

1.4 FRAGESTELLUNG DER ARBEIT

Im Sonderforschungsbereich TRR67 werden artifizielle extrazelluläre Matrices (aEZM) hinsichtlich ihrer Biokompatibilität untersucht und weiterentwickelt. Mit dem zugrunde liegenden Wissen über die physiologischen Abläufe der Wundheilung ist das grundlegende Konzept die Integration chemisch veränderter natürlicher Matrixkomponenten in eine kollagenbasierte aEZM. Vor allem sulfatierte GAG-Derivate sollen durch die Interaktion ihrer negativ geladenen Sulfatgruppen mit Zytokinen, Wachstumsfaktoren und dermalen Zellen einen positiven Einfluss auf den Wundheilungsprozess haben (Hintze et al. 2012; Pichert et al. 2012). Um den Einfluss sulfatierter GAG auf die Geweberegeneration zu untersuchen, eignet sich am besten die im nativen Zustand unsulfatierte HA, da dieses GAG eine gleichmäßige Struktur hat, nicht kovalent an Proteine gebunden ist und ohne Strukturverlust chemisch verändert werden kann (Barbucci et al. 1994).

In der Forschungsgruppe wird der Einfluss dieser aEZM auf Fb-Funktionen wie Adhäsion, Proliferation, Differenzierung und Matrixsynthese untersucht, da diese Zellen im Prozess der Wundheilung eine tragende Rolle spielen und von der umgebenden EZM in ihrer Funktion außerordentlich beeinflusst werden. Zusammen mit Kooperationspartnern um Dr. Martin von Bergen-Tomm wurde die Proteinexpression von auf aEZM kultivierten Fb im Proteom-weiten Ansatz per *stable isotope labeling by/with amino acids in cell culture* (SILAC)-Methode analysiert. Dabei konnten zahlreiche Proteine, deren Expression sich durch die Kultur der Fb auf den aEZM

ändert, identifiziert werden. Zu ihnen gehören Proteine des Matrixstoffwechsels (MMP-2, MMP-14, Koll I und Koll VI, Thrombospondin-1 (TSP-1)), sowie Proteine der Zell-Matrix-Interaktion und Regulation der Zellproliferation (CD44 und Ezrin) und schließlich α -SMA als Differenzierungsmarker der Fb zu MFb.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Einflusses der aEZM auf die Proteinexpression und den Matrixstoffwechsel von humanen dermalen Fb in einem vergleichbaren experimentellen Ansatz. Unter Verwendung anderer Nachweistechiken sollten die im o. g. Proteom-weiten Ansatz erhobenen Befunde überprüft und der Einfluss der genutzten aEZM auf die Synthese der Proteine unter den gewählten Kulturbedingungen untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit wurden daher humane dermale Fb auf Polysterol (PS), auf einer reinen Koll I-Matrix, einer Koll I/HA-Matrix und auf einer Koll I/sulfatierte HA (HA3.0)-Matrix kultiviert. Nach einer definierten Zeit wurde die Expression der o. g. Proteine mit Hilfe von elektrophoretischer Auftrennung und Western Blot-Analysen oder mittels Zymographie quantifiziert und die Ergebnisse mit den Befunden des Proteom-weiten Ansatzes verglichen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIALIEN

2.1.1 GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN

Blotting-System BIO-RAD Mini Trans-Blot®	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Centrifuge 5415 D (Tisch-Zentrifuge)	Eppendorf AG, Hamburg, D
Centrifuge 5810 R (Zellkultur-Zentrifuge)	Eppendorf AG, Hamburg, D
Centrifuge Mikro 200 R (Kühl-Zentrifuge)	Andreas Hettich GmbH und Co.KG, Tuttlingen, D
Cryo.s™ Einfrierröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Einengröhrchen Vivaspin 6	GE Healthcare, München, D
Einfrierbehälter „Mr. Frosty“	BRAND GmbH und Co.KG, Wertheim, D
Einmal-Küvette PS	BRAND GmbH und Co.KG, Wertheim, D
Filterpapier BIO-RAD Mini Trans-Blot®	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Flachbett-Gel Amersham™ ECL™	GE Healthcare, München, D
Flachbett-Gelkammer Amersham™ ECL™	GE Healthcare, München, D
Folienschweißgerät „Folio“ FS3602	Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern, D
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr Hausgeräte Ochsenhausen GmbH, Ochsenhausen, D
Gefrierschrank HERAfreeze® -80 °C	Heraeus Holding GmbH, Hanau, D
Hamilton-Spritze Gastight (50 µl, 100 µl)	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, CH
Inkubationsschrank Forma*Steri-Cycle* CO ₂ Incubator	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
INTAS Gel iX Imager	INTAS Science Instruments GmbH, Göttingen, D
Kühlschrank -4 °C	Privileg Quelle GmbH, Fürth, D
Lichtmikroskop Olympus CKX 41, Soft Imaging System	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, D
Lichtmikroskop Primo-Vert	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, D

Mini-PROTEAN [®] 3 Electrophoresis System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Minigel-Elektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
MINI SUB DNA CELL	
Neubauer-Zählkammer	LO-Laboroptik Ltd., Lancing, UK
Nitrozellulose-Membran Optitran	GE Healthcare, München, D
Whatman [®]	
ODYSSEY [®] Fc Dual-Mode Western Imaging	LI-COR [®] Biosciences, Lincoln, USA
pH-Meter pH 211R	HANNA [®] Instruments Deutschland GmbH Kehl am Rhein, D
Photometer Smart Spec [™] 3000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Pinzette	Carl Rotz GmbH und Co.KG, Karlsruhe, D
Pinzette mit Spitze (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Pipettenspitze (10 µl)	VWR International, LLC, Radnor, USA
Pipettenspitze (1000 µl)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Pipettenspitze (200 µl) ep.T.I.P.S	Eppendorf AG, Hamburg, D
Pipettierhilfe accu-jet [®] pro	BRAND Tech Scientific, Inc., Essex, USA
Polypropylenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Schüttler Vibramax 100	Heidolph Instruments GmbH und Co.KG, Schwabach, D
Sterilbank HERAsafe [®]	Heraeus Holding GmbH, Hanau, D
Stromversorger Consort EV ev231	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA
Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg, D
Variable Pipette Eppendorf Research	Eppendorf AG, Hamburg, D
Waage MC1 Laboratory 2200S	Sartorius AG, Göttingen, D
Zellkultur-Schale (94 mm x 16 mm), steril	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Zellkulturflasche (75 cm ²)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Zellschaber	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Zellsieb 70 µm Nylon BD Falcon	BD Bioscience, Bedford, USA

2.1.2 CHEMIKALIEN UND MEDIEN

Acrylamidlösung Rotiphorese [®] Gel 30	Carl Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe, D
Ammoniumpersulfat analytical grade	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
BIO-RAD Protein Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Blocking-Puffer	LI-COR [®] Biosciences, Lincoln, USA
BM-Cyclin	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Collagenase from <i>Clostridium histolyticum</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Coomassie PhastGel [™] BluR	GE Healthcare, München, D
Dimethylsulfoxid (DMSO) Uvasol [®]	Merck KGaA, Darmstadt, D
Dispase [®] II	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Dulbecco's PBS (1 x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 1 x	Biochrom AG, Berlin, D
Essigsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Essigsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe, D
Faltenfilter	Carl Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe, D
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom AG, Berlin, D
Glycin	Carl Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe, D
Glyzerin	Carl Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe, D
Gibco [®] Hank's Balanced Salt Solution	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Hepes Puffer (HBSS)	Promo Cell GmbH, Heidelberg, D
Isopropanol	Dr. Schumacher GmbH, Melsungen, D
Methanol	Mallinckrodt Baker, B.V., Deventer, NL
Mykokill AB (50 x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A

Natriumazid	Merck KGaA, Darmstadt, D
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe, D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH, Sankt Leon-Rot, D
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Complete Mini	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Salzsäure (HCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
β-Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt, D
Sucrose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
TEMED	Carl Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe, D
Tris-Puffer	Carl Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe, D
Triton® X-100	Ferak Laborat GmbH, Berlin, D
Trypsin/EDTA Solution 0,05 %/0,02 %	Biochrom AG, Berlin, D
Tween® 20	Carl Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe, D

2.1.3 LÖSUNGEN UND PUFFER

10 x Dispase® II-Lösung (22 U/ml)	10 x Dispase® II–Enzympulver 50 ml PBS
Gebrauchslösung (1 x) (2,2 U/ml)	10 % (v/v) 10 x Dispase® II–Lösung 90 % (v/v) PBS
Kollagenase-Lösung	50 mg Kollagenase–Enzympulver 20 ml Hepes Puffer 40 µl 1M CaCl ₂ Endkonzentration 2,5 mg Kollagenase und 2,0 µl 1M CaCl ₂ pro ml Hepes Puffer

Zellkultur-Medium	DMEM 10 % (v/v) FKS 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin
250 x BM-Cyclin	1 Fläschchen BM-Cyclin 10 ml PBS lagern bei 4 °C Endkonzentration 4 µl/ml Zellkultur-Medium (BM1 10 µg/ml, BM2 5 µg/ml)
Einfriermedium	DMEM 20 % (v/v) FKS 7 % (v/v) DMSO
RIPA-Lyse-Puffer	50 mM Hepes-Puffer 150 mM NaCl 5 mM EDTA 1 % (v/v) Triton [®] X-100 0,1 % (w/v) SDS 1 mM DTT
Sammelgel-Puffer	0,5 M Tris 0,4 % (w/v) SDS 0,01 % (w/v) Natriumazid pH 6,8
4 x Trenngel-Puffer	1,5 M Tris 0,4 % (w/v) SDS 0,01 % (w/v) Natriumazid pH 8,8

5 x Proben-Puffer (nach Laemmli)	51,23 % (v/v) Sammelgel-Puffer 41,06 % (w/v) Glyzerin 8,15 % (w/v) SDS 41,89 mM Bromphenolblau
10 x Kathoden-Puffer	0,25 M Tris 1,92 M Glycin 1 % (w/v) SDS 0,01 % (w/v) Natriumazid
Gebrauchslösung (1 x)	10 % (v/v) 10 x Kathoden-Puffer 90 % (v/v) H ₂ O
10 x Blotting-Puffer	1,92 M Glycin 0,25 M Tris 0,01 % (w/v) Natriumazid
Gebrauchslösung (1 x)	10 % (v/v) 10 x Blotting-Puffer 90 % (v/v) H ₂ O
10 x TBS/1 % Tween 20	0,5 M Tris 1,54 M NaCl 1 % (v/v) Tween 20 pH 8,4
Gebrauchslösung (1 x)	10 % (v/v) 10 x TBS/1 % Tween 20 90 % (v/v) H ₂ O
Blocking-Puffer	50 % (v/v) 1 x TBS/0,1 % Tween 20 50 % (v/v) LI-COR [®] Blocking-Puffer
Stripping-Puffer	0,2 M NaOH

Kollagenase-Denaturierungs-Puffer	20 % (w/v) SDS 0,12 M Sucrose 1,49 mM Bromphenolblau 25 % (v/v) Trenngel-Puffer
Renaturierungs-Puffer	2,5 % (v/v) Triton [®] X-100 in H ₂ O
Development-Puffer	0,05 M Tris pH 8,0 8 mM CaCl ₂
0,2 % Coomassie-Färbelösung	Coomassie-Tablette in 80 ml destiliertem Wasser (Aqua dest.) 120 ml Methanol filtrieren über Faltenfilter Lagerung bei 4 °C
Gebrauchslösung (0,1 %)	50 % (v/v) 0,2 % Coomassie-Färbelösung 50 % (v/v) Essigsäure
Coomassie-Entfärber	5 % (v/v) Methanol 7,5 % (v/v) Eisessig
APS	1,75 M in H ₂ O
Trenngel	30 % H ₂ O 0,1 % (v/v) Gelatine 9,9 % (v/v) Acrylamidlösung 25 % (v/v) Trenngel-Puffer 0,1 % (w/v) SDS 0,04 % (v/v) TEMED 4,38 mM APS

5 % Sammelgel61,6 % H₂O

4,92 % (v/v) Acrylamidlösung

24,8 % (v/v) Sammelgel-Puffer

0,1 % (w/v) SDS

0,1 % (v/v) TEMED

1,75 mM APS

Proteinase-InhibitorComplete Mini-Tablette in 1 ml H₂O

2.1.4 ANTIKÖRPER

Alle verwendeten primären Antikörper sind in **Tabelle 2** aufgeführt.

Tabelle 2: Primäre Antikörper

(Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) ist das für den Western-Blot verwendete Referenz-Gen)

<i>Antikörper</i>	<i>Verdünnung; Endkonzentration</i>	<i>Bezugsquelle</i>
Kaninchen-anti-Human-MMP-14, monoklonal	1:1000; 1 µg/ml	Epitomics, Inc., Burlingame, USA
Kaninchen-anti-Human-TSP-1, polyklonal	1:500; 2 µg/ml	Abcam plc, Cambridge, UK
Kaninchen-anti-Human-Ezrin	1:1000; 1 µg/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Kaninchen-anti-Human-Koll I, polyklonal	1:500; 2 µg/ml	Atlas Antibodies AB, Stockholm, S
Kaninchen-anti-Human-Koll VI, polyklonal	1:100; 10 µg/ml	Atlas Antibodies AB, Stockholm, S
Maus-anti-Human-α-SMA, monoklonal	1:200; 5 µg/ml	Abcam plc, Cambridge, UK
Maus-anti-Human-CD44, monoklonal	1:1000; 1 µg/ml	Bender MedSystems GmbH, Wien, A
Maus-anti-Human-GAPDH, monoklonal	1:1000; 1 µg/ml	Merck Millipore, Billerica, USA

Alle verwendeten sekundären Antikörper sind in **Tabelle 3** aufgeführt.

Tabelle 3: Sekundäre Antikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Bezugsquelle</i>
IRDye® 680LT Ziege-anti-Maus	1:15.000	LI-COR® Biosciences, Lincoln, USA
IRDye® 680LT Ziege-anti-Kaninchen	1:15.000	LI-COR® Biosciences, Lincoln, USA
IRDye® 800CW Ziege-anti-Kaninchen	1:15.000	LI-COR® Biosciences, Lincoln, USA

2.1.5 VERWENDETE SOFTWARE

cell^A	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, D
Image Studio Ver 1.1 Version 1.1.7 2010	LI-COR® Biosciences, Lincoln, USA
LabImage 1D Gel Analysis Software	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, D
GraphPad Prism® 4.0	GraphPad Software, Inc., San Diego, USA
Microsoft Office Excel 2003	Microsoft Corporation, Redmond, USA

2.2 MATRIXHERSTELLUNG UND BESCHICHTUNG DER ZELLKULTURSCHALEN

Die aEZM wurden als Beschichtungen auf Zellkultur-Schalen bereitgestellt. Als Kontrollwerte dienten PS und eine Koll I-Beschichtung, außerdem wurde eine aEZM mit Koll I und HA und eine weitere mit Koll I und sulfatierter HA angefertigt.

Für die Herstellung der aEZM wurde native, hoch-molekulare HA von Streptokokken aus der Herstellung von Aqua Biochem Dessau, D verwendet (van der Smitten et al. 2011). Kunze *et al.* und Hintze *et al.* beschrieben sowohl die Synthese der sulfatierten HA als auch die Herstellung der aEZM (Kunze et al. 2010; Hintze et al. 2009). Zusammenfassend wurde die Koll I/GAG-Matrix durch *in vitro* Fibrillogenese von Ratten-Koll I (BD Bioscience, Heidelberg, D) in Anwesenheit verschiedener GAG in Zellkulturschalen hergestellt. 1 mg/ml säuregelöstes Koll I wurde 1:1 mit der gleichen Konzentration hoch-molekularer HA gemischt. Die Fibrillogenese erfolgte für 16 - 18 h bei 37 °C. Nach zwei Waschschritten mit 0,5 ml sterilem *Aqua dest.* wurden die

Beschichtungen getrocknet. Vor der Kultivierung der Zellen auf der aEZM wurde diese für 1 h bei 37 °C mit PBS inkubiert. Das Verhältnis von Koll I zu GAG betrug für die weitere Verwendung in der Zellkultur 25:1.

2.3 METHODEN DER ZELLKULTIVIERUNG

Alle Arbeitsschritte der Zellkultur wurden, soweit nicht anders beschrieben, unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

2.3.1 ISOLIERUNG VON FIBROBLASTEN AUS HUMANER HAUT

Die Experimente zu dieser Arbeit wurden nach den Prinzipien der Deklaration von Helsinki (1975) durchgeführt und fand die Zustimmung der lokalen Ethik-Kommission (065-2009). Die verwendeten primären humanen dermalen Fb wurden aus Brust- oder Vorhaut gesunder Spender extrahiert. Zur Gewinnung der Fb wurden möglichst fettgewebtsfreie Areale der Haut ausgewählt und mehrmals mit PBS gespült. Daraufhin wurde die Haut in einer Petrischale mit einer Pinzette und einem Skalpell in ca. 3 x 3 mm große Stücke geschnitten. Anschließend wurde ein entsprechendes Volumen 1 x Dispase-Lösung auf die Hautstücke gegeben, sodass diese für 24 h fast frei schwimmend bei 4 °C gelagert werden konnten. Das Enzym Dispase trennt die Verbindungen zwischen Dermis und Epidermis. In einem zweiten Arbeitsschritt konnten diese mit Pinzetten voneinander separiert werden.

Die Dermis wurde im Anschluss 30 Minuten (min) bei 37 °C mit Kollagenase-Lösung inkubiert. Das Enzym Kollagenase ist durch seine proteolytische Aktivität in der Lage die strukturgebende EZM zu spalten und löst daher die Fb aus ihrer Umgebung.

Nach der erforderlichen Zeit wurde die Enzymreaktion durch die Zugabe von ca. 4 ml Fb-Nährmedium gestoppt und die Dermisstückchen durch einen 70 µm Filter gegeben. Das Filtrat wurde 8 min bei 450 x g zentrifugiert, das entstandene Zell-Pellett in 7 ml frischem Nährmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Zur Vorbeugung einer Infektion der Zellen mit Mykoplasmen wurde dem Medium 20 µl/ml Mykokill (50 x) zugefügt.

Die Kultivierung der gewonnenen Fb erfolgte in einem CO₂-Inkubator unter 5 % CO₂-Begasung und wassergesättigter Atmosphäre bei 37 °C.

Alle 48 - 72 h wurde das Nährmedium gewechselt und erneut Mykokill zugegeben.

2.3.2 PASSAGIEREN VON ZELLKULTUREN

Die Fb in den Zellkulturflaschen wurden alle 48 h unter dem Mikroskop begutachtet und bei Konfluenz passagiert. Dafür wurde zunächst das Fb-Nährmedium aus der Zellkulturflasche entfernt und die Flasche 2 x sorgfältig mit PBS gespült. Danach wurden die Fb mit 2 ml warmer Trypsin/EDTA-Lösung bedeckt, das Ablösen der Zellen unter dem Mikroskop kontrolliert und gegebenenfalls durch Klopfen beschleunigt. Anschließend wurde das Trypsin mit 2 ml serumhaltigem Fb-Nährmedium inaktiviert. Die Zellsuspension wurde nun in ein 15 ml PP-Röhrchen überführt und 4 min bei 200 x g zentrifugiert. Das so entstandene Pellett wurde in frischem Nährmedium resuspendiert und nach Ermessen auf die entsprechende Menge Zellkulturflaschen aufgeteilt.

2.3.3 ZELLEN EINFRIEREN UND AUFTAUEN

Um Fb langfristig aufzubewahren, können diese eingefroren und bei Bedarf wieder aufgetaut werden. Dafür wurden die Zellen wie oben beschrieben mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und zentrifugiert. Das Zellpellett einer Zellkulturflasche wurde in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in ein Einfrierröhrchen überführt. Dieses wurde dann in einem mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter „Mr. Frosty“ bei -80 °C gelagert. Dabei wurde die Zelllösung pro h um 1 °C heruntergekühlt. Um die Zellen bei Bedarf aufzutauen, wurde die gefrorene Zellsuspension mit warmem Nährmedium resuspendiert und in ein 15 ml PP-Röhrchen gegeben. Dann wurde die gelöste Menge 4 min bei 200 x g zentrifugiert, das Zellpellett mit frischem Nährmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

2.3.4 ZELLZÄHLUNG MIT EINER NEUBAUER-ZÄHLKAMMER

Um die Anzahl der Fb in einer Zellsuspension zu bestimmen, wurde eine Neubauer-Zählkammer genutzt. Dafür wurden o. g. Schritte des Passagierens der Zellkultur bis zum Erreichen des Zellpelletts durchgeführt. Dieses wurde nun in einem entsprechenden Volumen Nährmedium resuspendiert. Von dieser Menge wurden 20 µl in die Zählkammer gegeben. Nun konnten unter dem Mikroskop 16 Kleinquadrate ausgezählt und die Zellzahl nach folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Arithmetisches Mittel gezählter Fb} \cdot 10^4 = \text{Fb-Zahl pro ml Zellsuspension}$$

2.3.5 AUSSÄEN DER ZELLEN AUF BESCHICHTETEN ZELLKULTURSCHALEN

Für die Experimente auf den mit aEZM beschichteten Zellkulturschalen wurden Fb in den Passagen 2 - 8 verwendet. Um standardisierte Bedingungen zu erreichen, wurden je Zellkulturschale 350.000 Zellen ausgesät. Dafür wurden die Schalen zunächst eine Stunde mit 5 - 6 ml PBS bei 37 °C inkubiert, danach wurde das PBS verworfen. Anschließend wurde nach sorgfältigem Mischen die errechnete Menge der Zellsuspension und Fb-Nährmedium (Menge insgesamt 10 ml) auf die Zellkulturschalen gegeben und diese im CO₂-Inkubator unter 5 % CO₂-Begasung und wassergesättigter Atmosphäre bei 37 °C inkubiert.

Nach 72 h wurde das Fb-Nährmedium abgenommen und die Zellkulturschalen für die Gewinnung der serumfreien Überstände mit 6 ml frischem serumfreiem Fb-Nährmedium (0 % FKS, 1 % Pencicillin/Streptomycin) für weitere 24 h inkubiert. Die Überstände wurden abgenommen und die Fb anschließend für weitere 24 h mit 10 ml frischem serumhaltigen Fb-Nährmedium inkubiert.

2.4 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN

2.4.1 ISOLIERUNG UND KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON PROTEINEN

2.4.1.1 EINENGEN SERUMFREIER ÜBERSTÄNDE

Zum Nachweis extrazellulärer Proteine wurden die serumfreien Überstände unter sterilen Bedingungen nach 96 h der Fb-Kultur gewonnen. Die Überstände wurde anschließend unter nicht sterilen Verhältnissen in Einengröhrchen gegeben und bei 4 °C und maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert, bis sie ein aufkonzentriertes Endvolumen von 50 – 100 µl erreicht hatten.

2.4.1.2 GEWINNUNG VON ZELLLYSAT

Die folgenden Arbeitsschritte wurden bei 4 °C unter nicht sterilen Bedingungen durchgeführt.

Zum Nachweis zellulärer Proteine wurde aus den kultivierten Fb nach 5 d Zelllysate hergestellt. Dafür wurde das Medium verworfen, die Zellkulturschalen 2 x gründlich mit PBS gewaschen und die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst. Gegebenenfalls wurde unter Klopfen und Kreisen das Ablösen beschleunigt und die Schale mit einer Pipette von oben nach unten mit der Trypsin/EDTA-Lösung gespült.

Bei besonders fester Adhärenz der Fb an der Matrix wurde diese mit einem Zellschaber gelöst und mit einer Pipette maximal zerkleinert.

Um die Wirkung der Trypsin/EDTA-Lösung zu stoppen, wurden 4 ml Fb-Nährmedium auf die Schalen gegeben. Die Zellsuspension wurde nun unter Spülen in 15 ml PP-Röhrchen gegeben und 4 min bei 338 x g zentrifugiert.

Das entstandene Zellpellett wurde nun in 1 ml HBSS-Puffer resuspendiert und in 1 ml-Reaktionsgefäße überführt. Diese wurden dann erneut für 4 min bei 200 x g zentrifugiert.

Das so entstandene Zellpellett wurde anschließend in 100 µl RIPA-Lyse-Puffer aufgenommen, 30 min bei 4 °C inkubiert und schließlich 30 min bei 13.900 x g und 4 °C zentrifugiert. Dem Lyse-Puffer wurde vorher Protease-Inhibitor in einem Verhältnis von 1:10 zugesetzt, um zelleigene Proteasen zu hemmen und somit den Abbau von Proteinen während der Aufbereitung zu verhindern.

Abschließend wurde der Überstand vorsichtig aus den 1 ml-Reaktionsgefäßen abgenommen, nach der Proteinkonzentrationsbestimmung 1:5 mit 5 x Laemmli-Proben-Puffer versetzt und bei -80 °C eingefroren.

2.4.1.3 PROTEINKONZENTRATIONSBESTIMMUNG

Die Konzentrationsbestimmung der Proteine erfolgte mit einem Protein-Assay der Firma Bio-Rad nach der Bradford-Methode. Dabei wird der Farbstoff Coomassie Brilliantblau G250 verwendet, der mit den Proteinen Komplexe eingeht, die ein Absorptionsmaximum bei 595 Nanometern (nm) aufweisen. Dagegen zeigt der ungebundene Farbstoff ein Absorptionsmaximum bei 465 nm. Die Zunahme der Absorption verhält sich dabei proportional zur Proteinkonzentration.

Hierfür wurde der Bio-Rad Protein Assay zunächst 1:5 mit *Aqua dest.* verdünnt. Von dieser Mischung wurde 1 ml in Küvetten vorgelegt. Nach dem Bestimmen des Leerwertes wurden je 2 µl der zu messenden Probe verwendet, um mit einem Photometer die Proteinkonzentration zu bestimmen.

2.4.2 SDS–GELELEKTROPHORESE UND WESTERN BLOT

2.4.2.1 PROBENVORBEREITUNG

Um die zuvor gewonnenen Proben für die SDS–Gelelektrophorese vorzubereiten, wurde ein 10 – 20 µg Protein entsprechendes Volumen der Proben (wobei innerhalb eines Versuchs in jede Tasche die gleiche Menge Gesamtprotein der Proben aufgetragen wurde) zunächst mit 1 µl β-Mercaptoethanol versetzt und dann 10 min bei 95 °C erhitzt. Die Proteine wurden dadurch denaturiert, Disulfidbrücken gebrochen und eventuell vorhandene Proteasen gehemmt.

Vor dem Auftragen wurden die Proben noch einmal kurz zentrifugiert.

2.4.2.2 SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde nach der Methode von Laemmli durchgeführt (Laemmli 1979) und basiert auf der Auftrennung der Proteine aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichtes. Die Proteine wandern in einem elektrischen Feld durch die Gitterstruktur eines Polyacrylamid-Gels. Dabei befinden sie sich in Laemmli-Proben-Puffer, der SDS enthält, welches als stark negatives Detergens mit den Proteinen Komplexe bildet. Die Anzahl der angelagerten SDS-Ketten hängt hauptsächlich von der Proteingröße ab. Die Proteine haben dadurch ähnlich hydrodynamische Eigenschaften, sind negativ geladen und können keine Bindungen untereinander eingehen. Sie wandern so ihrer Größe entsprechend im SDS-Polyacrylamid-Gel zur Anode.

Die Auftrennung erfolgte in einem Flachbett-Gel-System mit einem SDS-Polyacrylamid-Gel, wobei die Konzentration des Gels sich je nach Proteingröße unterschied (10 %, 4 - 20 %, 8 - 16 %). Vor dem Trenngel der Flachbett-Gele befand sich ein Sammelgel, in welches die Taschen für die Probenauftragung eingelassen waren.

Jede Kammer wurde zunächst pro Kammerseite mit 90 ml 1 x Kathoden-Puffer gefüllt und das Flachbett-Gel nach dem Einsetzen 12 min bei 160 Volt (V) vorlaufen gelassen. Danach wurde der Kamm vom Gel entfernt und die so freigelegten Taschen mit 6 ml 1 x Kathoden-Puffer gefüllt. Nun konnten die Proben aufgetragen werden. In die erste Tasche wurde dabei stets 3 µl des Standardprotein-Mix PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas) und in die letzte Tasche 3 µl 5 x Laemmli-Proben-Puffer

pipettiert. Mit einer Spannung von 160 V wurden die Proteine zunächst in das Sammelgel transferiert und dann im Trenngel aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte für 1–1,5 h.

2.4.2.3 WESTERN BLOT

Die Methode des Western Blots dient zum Transfer der Proteine aus dem SDS-Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrozellulose-Membran. Hierbei wird eine Kopie des Gels produziert, wobei die Proteine auf der Membran immobilisiert werden.

Zunächst wurde 1 x Blotting-Puffer hergestellt und 1 h im Eis gekühlt, dann wurden 3 Stück Filterpapier und 1 Stück Nitrozellulose-Membran in Blotgröße geschnitten und das Blot-System in einer Eiswanne vorbereitet. Die Schwämme des Blot-Systems, das Filterpapier und die Nitrozellulose-Membran wurden für 10 min in 1 x Blotting-Puffer äquilibriert.

Das Gel wurde vorsichtig aus der Flachbett-Gelkammer herausgelöst und in eine Petrischale mit 1 x Blotting-Puffer gelegt.

Anschließend wurde der Blot nach folgendem Schema auf einem Gitter aufgebaut:

Kathode

Schwamm
2 x Filterpapier
SDS-Polyacrylamidgel
Nitrozellulose-Membran
1 x Filterpapier
Schwamm

Anode

Dabei wurde darauf geachtet, dass die Lagen luftblasenfrei aufgebracht wurden. Nun wurde der Blot in die vorbereitete Blotkammer eingesetzt und die Kammer mit 1 x Blotting-Puffer gefüllt. Der Transfer der Proteine erfolgte für 1,5–2 h bei konstanten 175 Milliampere (mA).

2.4.2.4 IMMUNODETEKTION VON PROTEINEN

Bei der Immunodetektion werden an die Nitrozellulose-Membran gebundenen Proteine mit spezifischen Primär-Antikörpern detektiert und mit Sekundär-Antikörpern sichtbar gemacht. Dabei bindet der Primär-Antikörper mit seiner Bindungsstelle an das

entsprechende Epitop des gesuchten Proteins, sodass der fluoreszierende Sekundär-Antikörper nun an den passenden Primär-Antikörper binden kann und die Proteine somit als Bande quantitativ detektierbar sind. Als Konjugate für Sekundär-Antikörper können sowohl rot als auch grün fluoreszierende Fluorophore verwendet werden.

Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurde die Nitrozellulose-Membran nach dem Blotten zunächst kurz in *Aqua dest.* gespült und anschließend für eine Stunde in Blocking-Puffer bei Raumtemperatur unter vorsichtigem Schütteln inkubiert.

Der spezifische Primär-Antikörper wurde zusammen mit dem Referenz-Antikörper Maus-Anti-GAPDH entsprechend seiner optimalen Konzentration (siehe Tabelle 2) in 1 ml frisch angesetzten Blocking-Puffer gegeben. In dieser Mischung wurde die Nitrozellulose-Membran eingeschweißt und über Nacht bei 4 °C leicht schwenkend inkubiert.

Um die Membran von überschüssigem Primär-Antikörper zu reinigen, wurde sie dann 3 x 5 min in 1 x TBS / 0,1 % Tween 20 gewaschen. Währenddessen wurde der fluoreszierende Sekundär-Antikörper in Blocking-Puffer verdünnt (siehe Tabelle 3) und die Membran nach dem Waschen 1 h bei Raumtemperatur in dieser Mischung lichtgeschützt inkubiert.

Anschließend wurde die Membran 2 x 5 min in 1 x TBS / 0,1 % Tween gewaschen und direkt analysiert oder getrocknet und lichtgeschützt bei Raumtemperatur aufbewahrt oder in 1 ml Blocking-Puffer eingeschweißt und bei -20 °C eingefroren.

Die Detektion der an die Nitrozellulose-Membran gebundenen Proteine wurde, ebenso wie die quantitative Analyse der Proteinbanden, mit einem Nahinfrarot-Fluoreszenz-Detektionssystem der Firma LI-COR durchgeführt.

2.4.2.5 MEMBRANSTRIPPING

Eine Membran kann insgesamt 2 - 3 x für die Immunodetektion verwendet werden. Dafür mussten zunächst alle Antikörper und Reagenzien durch 3 ca. 5-minütige Waschungen mit TBS / 0,1 % Tween 20 entfernt werden. Danach wurde die Membran 10 min bei Raumtemperatur in 15 ml 1:5 verdünntem Stripping-Puffer inkubiert und anschließend wieder für 3 x 5 min in TBS / 0,1 % Tween 20 gewaschen. Da nun alle Bindungsstellen erneut zur Verfügung standen, musste auch der Blocking-Vorgang

wiederholt werden. Die nächsten Schritte erfolgten wie bei oben beschriebener Immunodetektion.

2.4.3 ZYMOGRAPHIE

Die Zymographie ist eine proteinbiochemische Nachweismethode für Proteasen. Dabei werden die Proteine wie bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit Proben-Puffer versetzt, denaturiert und elektrophoretisch in einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Allerdings ist das Gel bei der Zymographie mit einem Substrat der nachzuweisenden Proteasen versetzt. So können beispielsweise Gelatinasen wie MMP-2 ein mit Gelatine polymerisiertes Gel verdauen. Die entsprechende Stelle im Gel kann anschließend durch Färbung sichtbar gemacht werden. Dabei heben sich helle Banden gegen den dunkelblauen Hintergrund ab, wobei die Stärke der Bande im Gel der Aktivität der Protease entspricht.

Da die Gelatinase MMP-2 von Fb in den Extrazellulärraum sezerniert wird, wurden für den Nachweis die isolierten serumfreien Überstände der kultivierten Zellen verwendet.

Zunächst wurde ein homogenes Trenngel in einem Giesssystem hergestellt und mit Isopropanol überschichtet, um eine gerade obere Kante herzustellen.

Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol abgezogen und das Trenngel mit einem 5 %-tigen Sammelgel überschichtet. Auf das Sammelgel wurde sofort ein Kamm aufgesetzt, um Taschen für das Auftragen der Proben freizuhalten. Für die Zusammensetzung der Gele siehe Tabelle 4.

Tabelle 4: Herstellung des Trenn- und Sammelgels für die Zymographie

<i>Trenngel</i>	<i>Sammelgel</i>
30 % H ₂ O	61,6 % H ₂ O
0,1 % (v/v) Gelatine	4,92 % (v/v) Acrylamidlösung
9,9 % (v/v) Acrylamidlösung	24,8 % (v/v) Sammelgel-Puffer
25 % (v/v) Trenngel-Puffer	0,1 % (w/v) SDS
0,1 % (w/v) SDS	0,1 % (v/v) TEMED
0,04 % (v/v) TEMED	1,75 mM APS
4,38 mM APS	

Währenddessen wurden die Proben für die Zymographie vorbereitet. Pro Probe wurden 5 µg Protein, welches einem Volumen von 0,5 µl bis 10 µl entsprach, eingesetzt. Die Proben wurden auf Eis aufgetaut, das entsprechende Volumen herausgenommen und mit serumfreiem Medium aufgefüllt, sodass alle Proteinproben mit dem gleichen Volumen aufgetragen werden konnten. Daraufhin wurden sie 1:1 mit Kollagenase-Denaturierungs-Puffer versetzt und kurz abzentrifugiert.

Nachdem auch das Sammelgel polymerisiert war, wurde der Kamm vorsichtig entfernt und das Gel in eine Elektrophorese-Kammer eingesetzt. Die entstandene innere Kammer zwischen den Gelen wurde mit 1 x Kathoden-Puffer gefüllt und die Taschen mit einer 100 µl Hamilton-Spritze vorsichtig gespült. Anschließend wurden die Proben mit einer 50 µl Hamilton-Spritze in die Taschen pipettiert, wobei in die erste Tasche ca. 3 µl des Molekulargewichtstandards PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas) und in die letzte Tasche eines Gels ca. 3 µl Kollagenase-Denaturierungs-Puffer gegeben wurde.

Dann wurde die Elektrophorese-Kammer zur Hälfte mit 1 x Kathoden-Puffer gefüllt und mit dem Deckel fest verschlossen. Die Elektrophorese erfolgte für ca. 45 min bei 200 V, wurde anschließend gestoppt und das Gel aus der Kammer genommen. Das Trenngel wurde für 30 min bei Raumtemperatur leicht schwenkend in Triton® X-100-haltigem Renaturierungs-Puffer inkubiert und anschließend für den Gelatinaseverdau auf dem Rüttler über Nacht in Development-Puffer inkubiert.

Die Färbung erfolgte mit 0,2 % Coomassie-Färbelösung schwenkend für 30 min. Anschließend wurde das Gel in Entfärber-Lösung in Bewegung unter mehrmaligem Wechseln entfärbt, bis sich die hellen Banden deutlich vom blauen Hintergrund unterschieden.

Das Gel wurde mit Unterlicht in einem Gel-Dokumentations-System (INTAS) fotografiert und die Banden mit der Software LabImage 1D Gel Analysis Software analysiert.

2.5 GRAFISCHE AUSWERTUNG UND STATISTIK

Pro Protein wurden mindestens n=6 Versuche zur Auswertung herangezogen. Die Werte des Western-Blots wurden jeweils mit der entsprechenden Referenz-Bande normiert.

Die n-fache Induktion wurde auf die Kontrolle PS bezogen berechnet, um die Werte untereinander vergleichbar zu machen.

Die Darstellung der Kontrolldaten erfolgte mit dem Programm Microsoft Office Excel 2003.

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit dem Programm GraphPad Prism 4.0 durchgeführt. Zur Berechnung der Signifikanzen wurde der Man-Whitney t-Test verwendet, wobei p-Werte $\leq 0,05$ (*) als signifikant festgelegt wurden. Des Weiteren galt ein p-Wert $\leq 0,01$ (**) als höhere Signifikanzstufe.

3. ERGEBNISSE

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von aEZM auf die Proteinexpression humaner dermaler Fb untersucht. Dabei wurden eine Koll I/HA-Matrix und eine Koll I/HA3.0-Matrix verwendet. Als Kontrollwerte dienten eine Koll I-Matrix und PS. Die dermalen Fb wurden zunächst aus humaner Haut isoliert, in Kultur gebracht und anschließend auf die Matrix-beschichteten Zellkulturschalen aufgetragen. Dabei wurden je Schale 350.000 Fb der Passagen 2 – 8 ausgesät. Nach 72 h wurde das serumhaltige Kulturmedium durch serumfreies Medium ersetzt, welches nach weiteren 24 h wieder abgenommen wurde. Hieraus konnte nun die MMP-2-Expression der Fb mittels Zymographie quantitativ erfasst werden. Anschließend wurden die Fb weitere 24 h mit serumhaltigem Medium kultiviert. Nach einer Gesamt-Kulturzeit von 5 d konnten die kultivierten Fb lysiert und die zu untersuchenden Proteine mit Western Blot quantitativ aus dem Gesamtprotein identifiziert werden. Zur Darstellung der Fb-Proteinexpression auf den verschiedenen Matrices wurden die Zymographie-, bzw. Western Blot-Werte untereinander verglichen. Zusätzlich lag ein besonderes Augenmerk auf dem Einfluss der sulfatierten Koll I/HA3.0- gegenüber der unsulfatierten Koll I/HA-Matrix.

3.1 MORPHOLOGIE DER KULTIVIERTEN FIBROBLASTEN

Nach der 5-tägigen Kultur der Fb auf den aEZM waren die Zellen subkonfluent (siehe Abb. 2). Die Fb zeigten ihre typische spindelförmige Gestalt. Zudem waren keine auffälligen morphologischen Unterschiede im Wachstum der Zellen auf den Matrices zu erkennen.

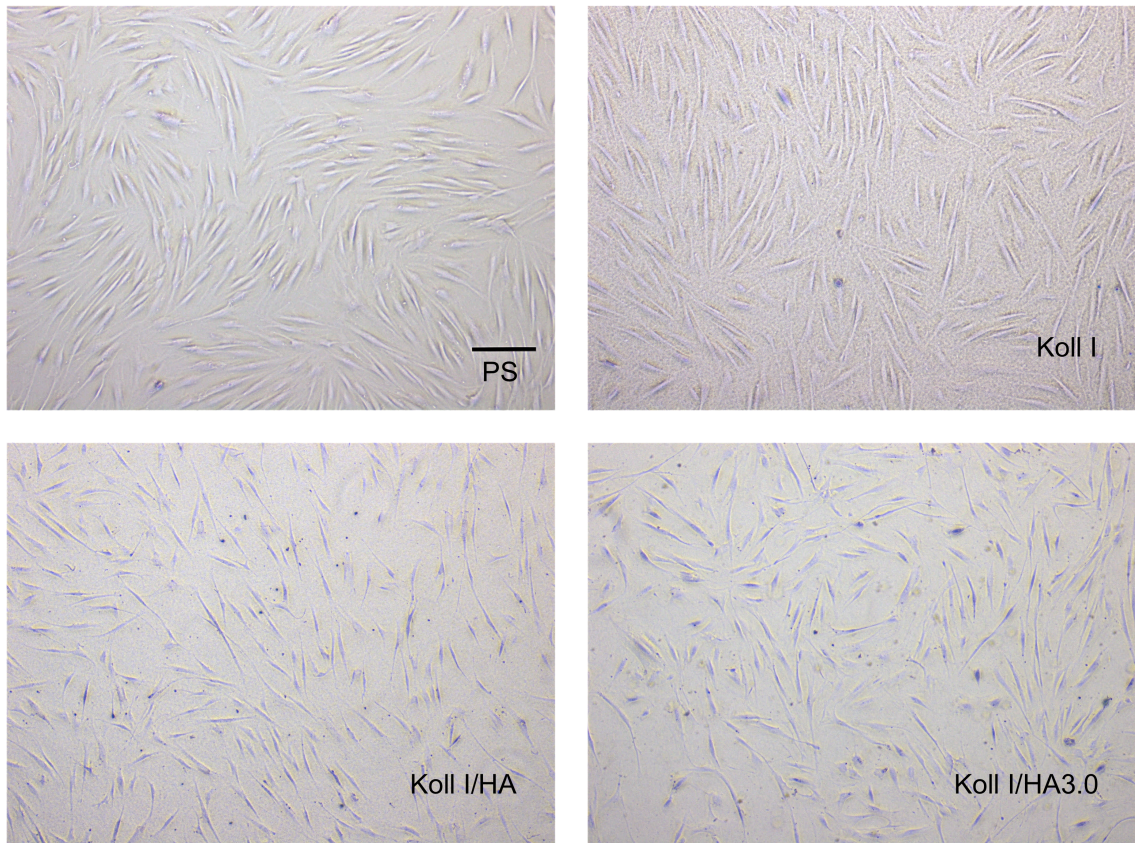


Abbildung 2: Subkonfluente Fb nach 5-tägiger Kultur auf den Matrices, bzw. PS

- a) PS
- b) Koll I
- c) Koll I/HA
- d) Koll I/HA3.0

(Messbalken entspricht 200 μm , Vergrößerung 4x)

3.2 KONTROLLUNTERSUCHUNGEN

3.2.1 BIOLOGISCHES SYSTEM

Die Experimente der vorliegenden Arbeit konnten potentiell von diversen Faktoren beeinflusst werden. Daher ist es wichtig diese Faktoren als mögliche Fehlerquellen zu identifizieren und zu überprüfen. Obwohl die gleiche Zellzahl pro Fläche eingesetzt wurde, die Fb eine gleich lange Inkubationszeit hatten und die Kulturbedingungen, unter denen die Fb auf den aEZM kultiviert wurden, identisch waren, stellt die biologische Varianz bei den durchgeführten Experimenten eine Variable dar. Dabei spielen Faktoren wie das Alter der Spender, das Geschlecht und die originäre Lokalisation der Spender-Haut eine wichtige Rolle. Variieren diese Faktoren, so können

die aus der Spender-Haut extrahierten Fb z. B. unterschiedliche Proliferationsraten haben, welche in variablen Zelldichten resultieren könnten.

3.2.2 METHODIK

Auch in der Methodik gibt es in den verschiedenen Schritten Variablen, die es zu überprüfen gilt. Bei der Durchführung der SDS-Gelelektrophorese wurde bei jedem Versuch die gleiche Proteinmenge in die Taschen des Gels pipettiert. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine mit dem Blotting-Verfahren auf eine Membran übertragen. Dabei sollte eine Blotting-Zeit und -Stärke gewählt werden, die eine Übertragung der großen Proteine gewährleistet und gleichzeitig kleine Proteine nicht durch die Membran blotten lässt. Zur Kontrolle wurde das Gel nach dem Blotten mit einer Coomassie-Färbelösung angefärbt und mit Unterlicht in einem Gel-Dokumentations-System (INTAS) fotografiert (siehe Abb. 3)

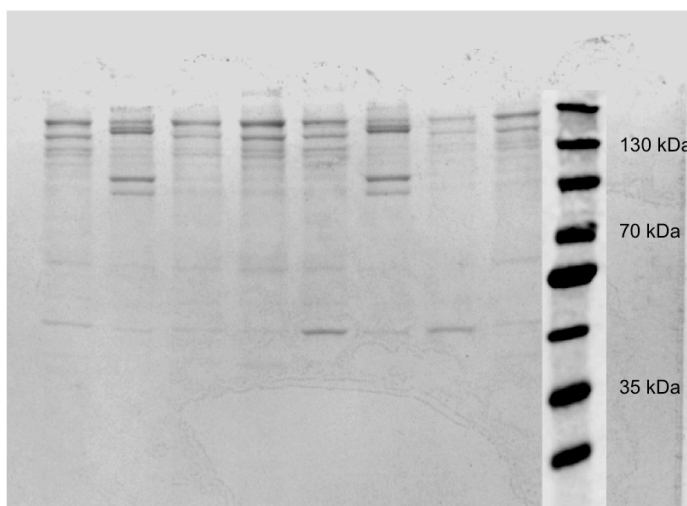


Abbildung 3: Unterlicht-Fotografie eines Elektrophorese-Gels

Fotografiert nach der Auftrennung der Proteine im Gel und Blotten auf die Nitrozellulose-Membran. Rechts im Bild befinden sich zum Vergleich der Proteingröße die Marker-Banden des Molekulargewichtstandards.

Dabei zeigte sich, dass während des Blottens tatsächlich etwas Protein auf dem Gel verblieb. Es handelte sich jedoch hauptsächlich um Reste von Proteinen mit einem Molekulargewicht über 130 Kilodalton (kDa).

Es kann somit nicht gewährleistet werden, dass Proteine mit großem Molekulargewicht mit gleicher Effizienz auf die Nitrozellulose-Membran geblottet werden wie Proteine mit einem kleinen Molekulargewicht.

Tabelle 5 zeigt eine Übersicht der Molekulargewichte der in dieser Arbeit untersuchten Proteine.

Tabelle 5: Darstellung des Molekulargewichts der mit Western Blot untersuchten Proteine in kDa

<i>Protein</i>	<i>Molekulargewicht in kDa</i>
MMP-14	66
TSP-1	120
Koll I	134
Koll VI	108
CD44	85
Ezrin	69
α -SMA	42

3.2.3 KONTROLLE DER VERSUCHSBEDINGUNGEN

Um die Versuchsbedingungen im Allgemeinen zu überprüfen, wurden die Banden des verwendeten Referenzproteins GAPDH hinsichtlich zweier Fragestellungen miteinander verglichen.

1. Wie vergleichbar sind Western Blot-Intensitäten von Parallelversuchen?
2. Ist die GAPDH unter den Versuchsbedingungen ein schwach reguliertes Referenz-Gen für die Normalisierung der Auswertung?

Um die erste Frage zu beantworten, wurden die Signalstärken der GAPDH-Banden eines identischen Zelllysats in verschiedenen Western Blot-Versuchen (verschiedene Membranen) untereinander verglichen und in Abb. 4 exemplarisch dargestellt. Da in den hier verglichenen Proben pro Versuch 20 µg des Gesamtproteins in die Taschen des Gels gegeben wurden, sollte auch die Intensität der GAPDH-Bande jeweils annähernd gleich sein. Zu Unterschieden in der Intensität zwischen den einzelnen Proben könnte es jedoch z. B. durch Variablen im Blotting-Vorgang, bei der Proteinbestimmung, durch unterschiedliche Antikörper-Bindungen oder durch unterschiedliche Hintergründe bei der fluoreszenzbasierten Detektion und Auswertung der Protein-Banden (*signal to noise ratio*) gekommen sein.

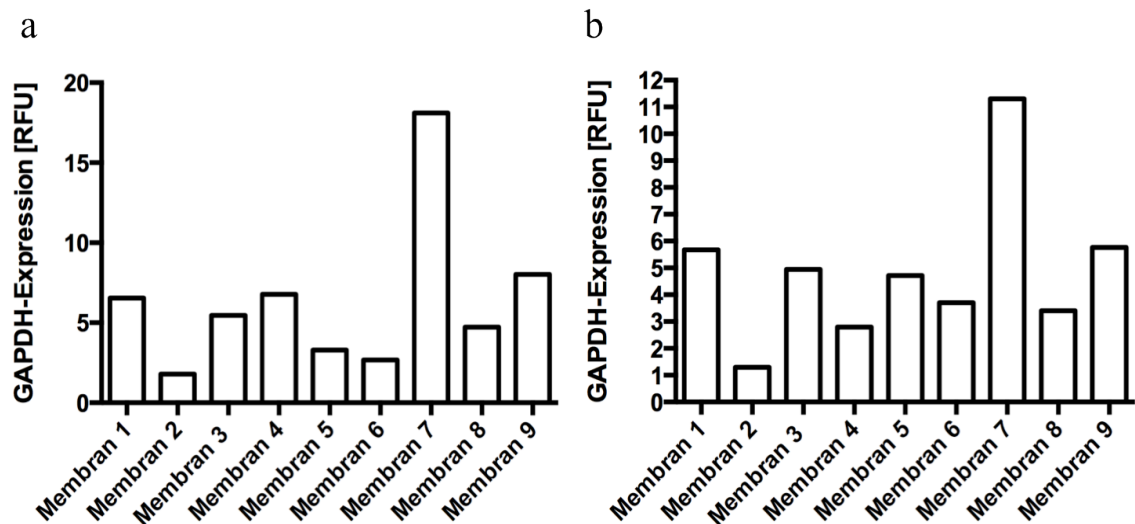


Abbildung 4: Vergleichbarkeit der Western Blot-Intensitäten von Parallelversuchen

Exemplarische Darstellung der Western Blot-Intensitäten der GAPDH-Bande zweier verschiedener Zelllysate (a und b) bei Parallelversuchen (Membran 1-9), die y-Achse zeigt die GAPDH-Expression im Zelllysate auf den verschiedenen Membranen in *relative fluorescence units* [RFU].

In Abb. 4 zeigen sich Unterschiede der absolut gemessenen Intensitäten der GAPDH von identischen Zelllysaten auf unterschiedlichen Membranen zur Detektion verschiedener Proteine in diesem Lysat. Dies führte zu der Festlegung, die GAPDH auf jeder Membran individuell mitzuführen und zur Auswertung zu verwenden.

Die zweite o. g. Fragestellung bezieht sich auf die Verwendung von GAPDH als Referenz-Protein, mit dem sich die Signalwerte der zu untersuchenden Proteine normieren lassen. Um als Solches verwendet zu werden, sollte die GAPDH unter allen Versuchsbedingungen nicht reguliert werden und unabhängig von den Matrices eine einheitlich starke Intensität der Banden zeigen. In Abb. 5 wurde exemplarisch die Signalstärke der GAPDH-Bande aller Versuchsbedingungen eines Versuchs (eine Membran mit 3 unterschiedlichen Fb-Chargen) miteinander verglichen. Schwankungen dieser Werte könnten wiederum auch durch die bei Fragestellung 1 genannten methodischen Variablen auftreten.

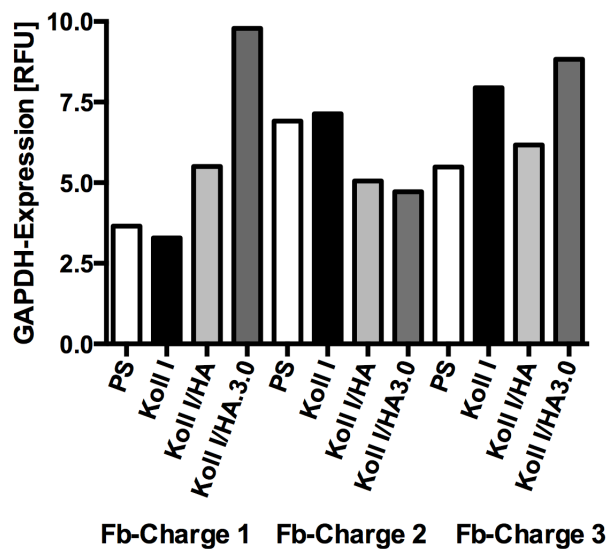


Abbildung 5: Überprüfung der GAPDH als Referenz-Gen

Exemplarische Darstellung der Western Blot-Intensitäten der GAPDH-Bande von 3 unterschiedlichen Fb-Chargen unter jeweils allen Versuchsbedingungen (Substrate, bzw. PS), die y-Achse zeigt die GAPDH-Expression in den unterschiedlichen Zelllysaten in *relative fluorescence units* [RFU].

Abbildung 5 zeigt Schwankungen der Signalstärke der GAPDH-Banden unter allen Bedingungen in einem Versuch. Auch dies weist darauf hin, dass die methodischen Variablen hierbei einen Einfluss gehabt haben können. Jedoch lässt sich kein Trend der Werte erkennen, der anzeigen würde, dass die GAPDH unter den hier aufgestellten Versuchsbedingungen (z. B. auf einer bestimmten Matrix) reguliert wurde. Auf Basis dieser Daten wurde festgelegt, dass die GAPDH mit Einschränkungen als Referenz-Gen für die Auswertung der Expressionsstudien nutzbar ist.

3.3 PROTEINEXPRESSION DER FIBROBLASTEN

Es ist von großem Interesse aEZM hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf das humane Gewebe und im Speziellen auf die Fb-Funktion zu untersuchen. Aufschlüsse darüber bietet die Quantifizierung der von den Fb exprimierten Proteine nach Kontakt mit der aEZM.

3.3.1 PROTEINE DES MATRIXSTOFFWECHSELS

3.3.1.1 MATRIXMETALLOPROTEINASEN

Für den regelrechten Ablauf der Wundheilung und die Vermeidung von fibrotischem Gewebe ist eine strenge Regulation von Matrixsynthese und -abbau notwendig (Langholz et al. 1995). Der Kollagenabbau ist eine der Hauptaufgaben der MMP, die

hauptsächlich von Fb synthetisiert werden. Daneben spielen sie noch durch weitere Funktionen eine entscheidende Rolle im Ablauf der Wundheilung (Gill & Parks 2008; Rodríguez et al. 2010; Page-McCaw et al. 2007).

MMP-2, oder Gelatinase A, wird in der inaktiven Form synthetisiert und extrazellulär durch MMP-14 im Komplex mit TIMP-2 in die aktive Form gespalten (Strongin et al. 1995; Nagase 1998). Für die Untersuchung der MMP-2-Synthese durch die Fb wurden daher die nach 72 h abgenommenen serumfreien Überstände verwendet. Mittels Gelatine-Zymographie konnte die Menge des Proteins in Abhängigkeit von den verwendeten aEZM ermittelt werden. Dabei wurde das Gesamtprotein der jeweiligen Probe in einem Gelatine-haltigen Gel elektrophoretisch aufgetrennt und das Gel anschließend eingefärbt. Innerhalb eines Versuchs wurde in jede Tasche die gleiche Menge Gesamtprotein der Proben aufgetragen. Das Auftreten und die Stärke heller Banden im Gel korrelierten mit der Aktivität und der Quantität der Gelatinase A in der Probe.

Abbildung 6(a) zeigt exemplarisch eine durchgeführte Zymographie, während in Abb. 6(b) die quantitative Auswertung mehrerer Zymographien dargestellt wird. Es zeigte sich, dass auf PS kultivierte Fb die größte Menge MMP-2 synthetisierten. Auf Koll I wurde geringfügig weniger gebildet als auf PS, jedoch zweifach signifikant mehr als auf der Koll I/HA3.0-Matrix. Die Fb, die auf Koll I/HA kultiviert wurden, zeigten eine geringere MMP-2-Synthese als die Fb auf Koll I und PS, jedoch einfach signifikant mehr als die Zellen auf der sulfatierten Koll I/HA3.0-Matrix.

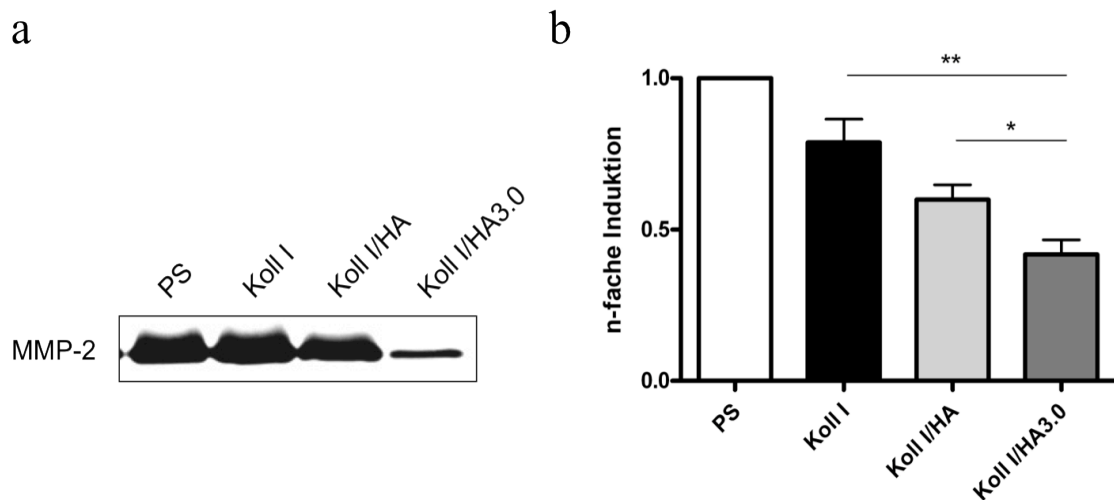


Abbildung 6: Expression von MMP-2 durch die Fb nach der Kultur auf den Substraten, bzw. PS

Exemplarische Darstellung einer Zymographie des Proteins MMP-2 (a) und zusammengefasste Quantifizierung der Proteinexpression von MMP-2 in Abhängigkeit von den aEZM (n=7) (b).

Zusammenfassend konnte nach 72-stündiger Inkubation ein signifikanter Einfluss von HA auf die MMP-2-Expression durch die Fb gegenüber der Kultur auf PS und reinem Koll I gezeigt werden. Die Addition von sulfatierter HA hatte eine weitere signifikante Reduktion der MMP-2-Synthese zur Folge.

Das Protein MMP-14 wurde in dieser Arbeit mit der Methode des Western Blots nachgewiesen. Dazu wurde es elektrophoretisch aus dem Gesamtprotein der Fb, die auf den aEZM kultiviert wurden, aufgetrennt und mit Antikörper-Detektion quantitativ erfasst. Die Signalstärke der Bande, die durch ein Primär- / Sekundärantikörpersystem markiert wurde, entsprach dem Anteil von MMP-14 am Gesamtprotein.

Nach 5-tägiger Kultur der Fb auf den aEZM war ein geringer Anstieg der Proteinmenge auf Koll I im Gegensatz zur Kultur auf PS sichtbar. Ein weiterer Anstieg zeigte sich auf Koll I/HA, wobei hier signifikant mehr MMP-14 synthetisiert wurde als auf der Koll I-Matrix. Die Menge MMP-14 der auf Koll I/HA3.0 kultivierten Fb entsprach wiederum annähernd dem Wert der Koll I-Matrix, war aber im Vergleich zu PS erhöht (siehe Abb. 7).

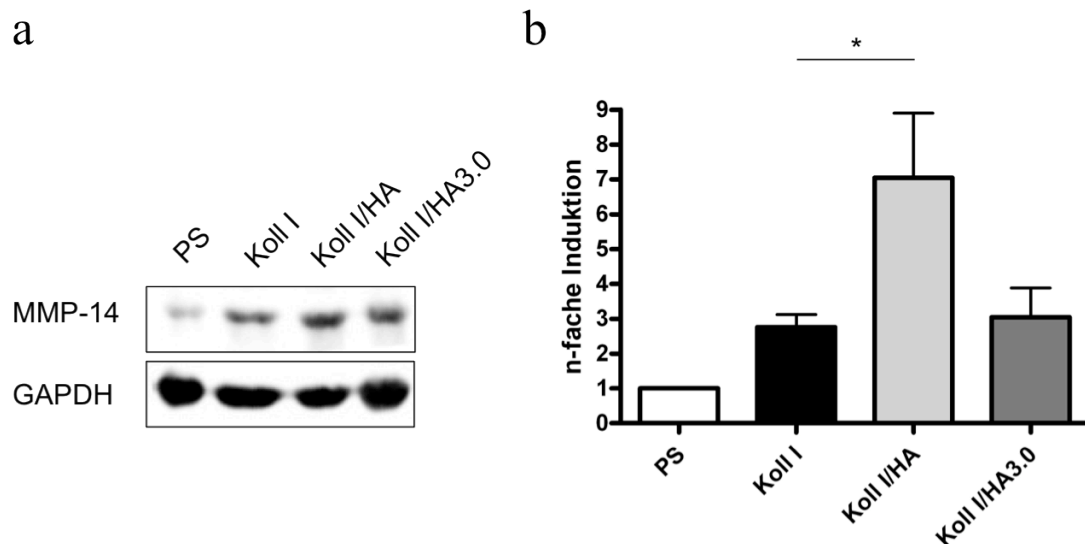


Abbildung 7: Expression von MMP-14 durch die Fb nach der Kultur auf den Substraten, bzw. PS

Exemplarische Darstellung eines Western Blots des Proteins MMP-14 (a) und zusammengefasste Quantifizierung der Proteinexpression von MMP-14 in Abhängigkeit von den aEZM (n=6) (b).

Insgesamt hatte das Einbringen von HA in die Koll I-Matrix eine signifikante Erhöhung der Expression von MMP-14 zur Folge. Dieses Phänomen wurde jedoch durch die Sulfatierung der HA wieder aufgehoben. Es kam hierbei zu einer Halbierung der Synthese von MMP-14 auf Koll I/HA3.0 im Gegensatz zur unsulfatierten Koll I/HA-Matrix.

3.3.1.2 KOLLAGENE

Die strukturgebenden Kollagene gehören zu den Hauptbestandteilen der dermalen Matrix und werden neben anderen Komponenten der EZM von den Fb synthetisiert (Fritsch 2004). Um die Fähigkeit der Fb zur Synthese nativer EZM zu überprüfen, wurden sie nach 5-tägiger Kultur auf den aEZM hinsichtlich der Expression von Koll I und Koll VI auf Proteinebene mit der Western Blot-Methode untersucht.

Kollagen I ist das häufigste Koll in der dermalen EZM (Schultz et al. 2005) und verleiht dem Gewebe seine Zugfestigkeit. Abbildung 8 zeigt die Proteinexpression der Fb in Abhängigkeit von den aEZM. Unter den Versuchsbedingungen der vorliegenden Arbeit konnte kein signifikanter Unterschied in der Koll I-Expression durch die Fb festgestellt werden. Es trat lediglich eine leichte Verringerung der Proteinmenge auf der Koll I-Matrix gegenüber PS und Koll I/HA auf. Die auf PS kultivierten Fb synthetisierten etwa gleich viel Koll I wie die Fb auf Koll I/HA. Nur die sulfatierte Koll I/HA3.0-Matrix

erhöhte die Synthese von Koll I gegenüber PS, der Koll I- und der Koll I/HA-Matrix geringfügig.

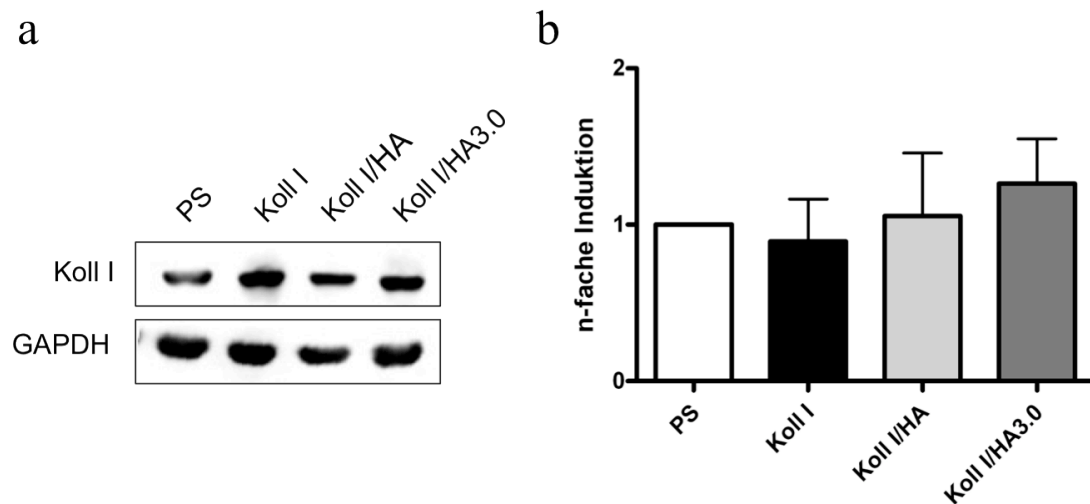


Abbildung 8: Expression von Koll I durch die Fb nach der Kultur auf den Substraten, bzw. PS

Exemplarische Darstellung eines Western Blots des Proteins Koll I (a) und zusammengefasste Quantifizierung der Proteinexpression von Koll I in Abhängigkeit von den aEZM (n=6) (b).

Das mikrofibrilläre Koll VI befindet sich in den meisten interstitiellen Bindegeweben. Es verknüpft u. a. Koll I und III miteinander (Bonaldo et al. 1990) und bindet an Zelloberflächenrezeptoren wie HA (Aumailley et al. 1991; Knupp & Squire 2001).

Die 5-tägige Kultur der Fb auf aEZM und die nachfolgende Untersuchung des Gesamtproteins mit Western Blot zeigten, dass die geringste Menge Koll VI auf PS gebildet wurde. Auf der Koll I- und der Koll I/HA-Matrix wurde etwa ein Drittel mehr Koll VI als auf der Kontrolle PS synthetisiert. Die Kultur der Fb auf der sulfatierten Koll I/HA3.0-Matrix steigerte die Synthese von Koll VI wiederum um ein Drittel gegenüber den anderen Matrices (siehe Abb. 9).

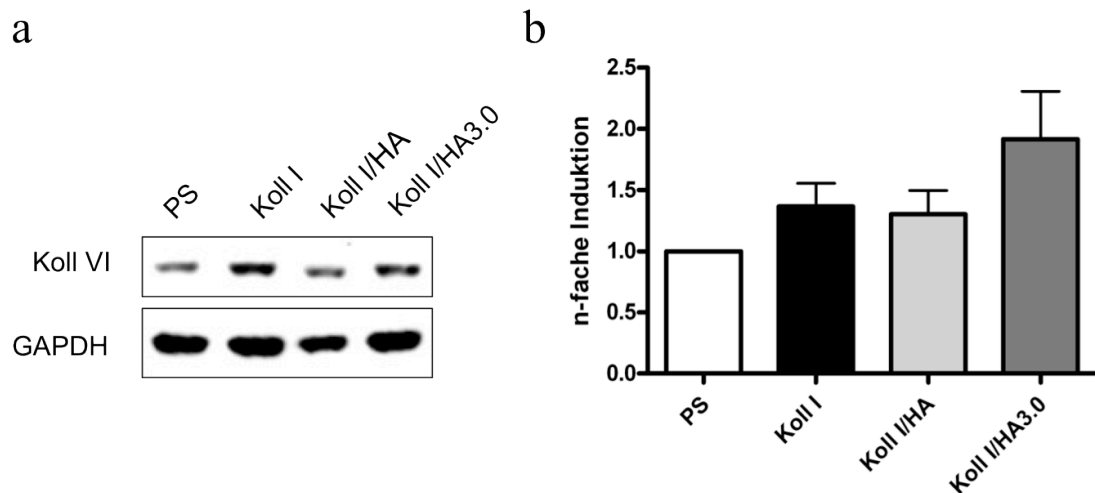


Abbildung 9: Expression von Koll VI durch die Fb nach der Kultur auf den Substraten, bzw. PS

Exemplarische Darstellung eines Western Blots des Proteins Koll VI (a) und zusammengefasste Quantifizierung der Proteinexpression von Koll VI in Abhängigkeit von den aEZM (n=6) (b).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Kombination von HA und Koll I keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von Koll VI gegenüber PS und der Koll I-Matrix hat. Die Sulfatierung der HA in Koll I/HA3.0 hingegen bewirkte eine sichtbare Steigerung der Koll VI-Synthese gegenüber den anderen Matrices und der Kontrolle PS.

3.3.1.3 THROMBOSPONDIN-1

Das extrazelluläre Protein TSP-1 dient in der dermalen EZM der Vermittlung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen (Bornstein 1995), wobei seine Eigenschaften stark vom Bindungspartner abhängig sind. Nach der Kultur der humanen dermalen Fb auf PS und den verschiedenen aEZM sowie den darauffolgenden Untersuchungen mit der Methode des Western Blot zeigte sich ein Einfluss der kombinierten Koll I/HA-Matrix auf die Synthese von TSP-1 gegenüber den Kontrollen Koll I und PS (siehe Abb. 10). Koll I/HA regte die Fb zu einer ca. verdoppelten Expressionsrate von TSP-1 im Vergleich zu PS an. Gleichzeitig wurde hier etwa ein Drittel mehr TSP-1 als auf der Koll I-Matrix gebildet. Die sulfatierte Koll I/HA3.0-Matrix senkte wiederum die Expression von TSP-1 gegenüber Koll I/HA um die Hälfte. Somit entsprach die TSP-1-Menge auf Koll I/HA3.0 ungefähr dem Wert der Kontrolle PS.

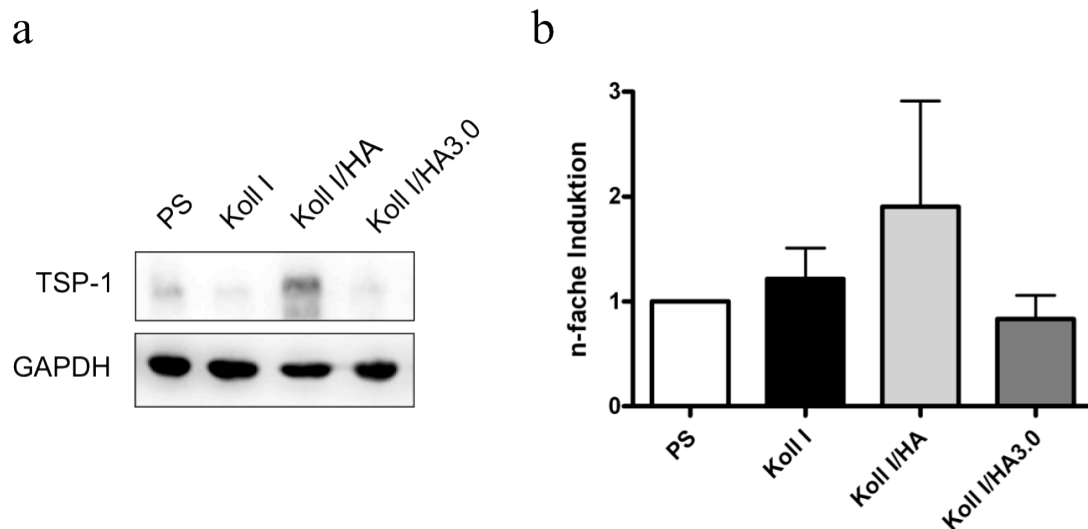


Abbildung 10: Expression von TSP-1 durch die Fb nach der Kultur auf den Substraten, bzw. PS

Exemplarische Darstellung eines Western Blots des Proteins TSP-1 (a) und zusammengefasste Quantifizierung der Proteinexpression von TSP-1 in Abhängigkeit von den aEZM (n=6) (b).

Insgesamt kann den im Diagramm dargestellten Ergebnissen ein induzierender Effekt von Koll I/HA auf die TSP-1-Expression entnommen werden. Dieser Effekt war jedoch durch die Sulfatierung der HA in der Koll I/HA3.0-Matrix wieder rückläufig, sodass die Expressionsrate von TSP-1 auf dieser Matrix ungefähr den Werten der Kontrollen PS und Koll I entsprach.

3.3.2 PROTEINE DER ZELL-MATRIX-INTERAKTION UND DER REGULATION DER PROLIFERATION

Die Interaktion der Fb mit der EZM, in die sie eingebettet sind, ist von entscheidender Bedeutung für ihre Funktion in der Wundheilung. Sie findet u. a. über Rezeptoren statt, die an der Zelloberfläche der Fb exprimiert werden. Um diese Wechselwirkungen zu untersuchen, wurden die für 5 d auf aEZM kultivierten humanen dermalen Fb im Western Blot hinsichtlich der Expression zweier spezifischer Proteine untersucht.

3.3.2.1 CD44

Das Zelloberflächenglykoprotein CD44 wird ubiquitär exprimiert (Martin et al. 2003) und dient als Oberflächenrezeptor der Fb für HA (Underhill 1992). Diese Bindung beeinflusst die Zellmotilität und die Zellproliferation und vermittelt die Aufnahme wie auch den Auf- und Abbau von HA (Underhill 1992).

Das Diagramm in Abb. 11(b) zeigt die Expressionsrate von CD44 durch die Fb nach der 5-tägigen Kultur auf aEZM. Es lässt erkennen, dass die Fb auf der Kontrollmatrix Koll I eine leicht geringere Menge CD44 gegenüber der Kontrolle PS synthetisierten. Auf der Koll I/HA-Matrix dagegen stieg die Menge des Proteins gegenüber PS und Koll I leicht an, während der Wert von Koll I/HA3.0 ungefähr dem Wert der Kontrolle PS entsprach.

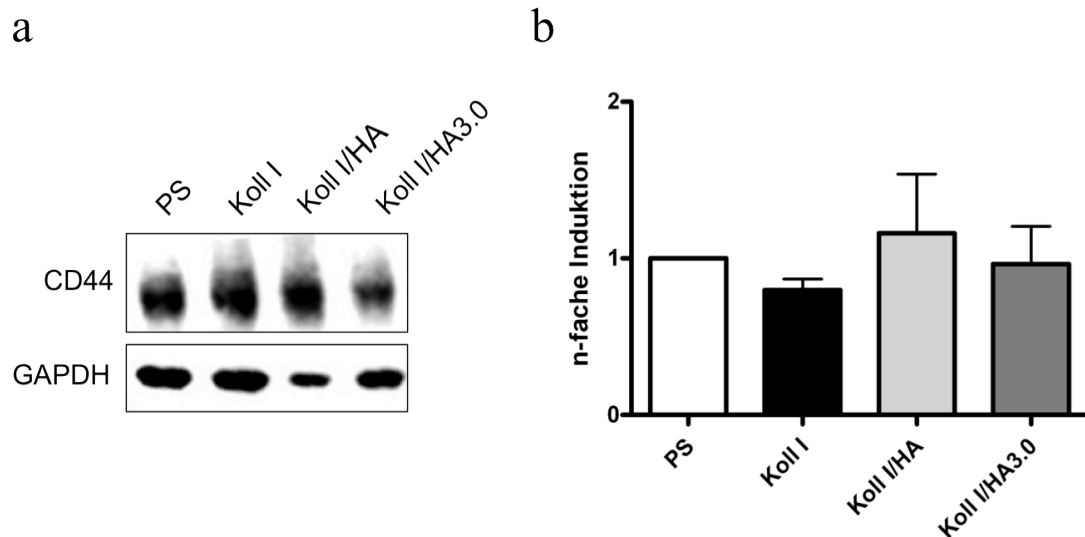


Abbildung 11: Expression von CD44 durch die Fb nach der Kultur auf den Substraten, bzw. PS

Exemplarische Darstellung eines Western Blots des Proteins CD44 (a) und zusammengefasste Quantifizierung der Proteinexpression von CD44 in Abhängigkeit von den aEZM (n=6) (b).

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Kombination von Koll I und HA die Expression von CD44 gegenüber der Kultur der Fb auf PS oder reinem Koll I gering steigerte. Die Sulfatierung der HA verringerte jedoch die Expressionsrate von CD44 wieder. Insgesamt ließen sich dennoch keine signifikanten Änderungen der CD44-Expression durch die Kultur auf den verschiedenen untersuchten Matrices nachweisen.

3.3.2.2 EZRIN

Auch das Protein Ezrin, das zu der Ezrin-Radixin-Moesin (ERM)-Proteinfamilie gehört, vermittelt als Verbindung zwischen Molekülen der Plasmamembran (z. B. CD44) und dem Zytoskelett Interaktionen zwischen den Zellen und der umliegenden EZM (Yonemura et al. 1999). Außerdem wird ihm als prokontraktilen Protein eine Beteiligung an der Zellmotilität zugeschrieben (Hiscox & Jiang 1999).

Abbildung 12 zeigt, dass die Expression von Ezrin durch die kultivierten Fb auf der Kontrollmatrix Koll I etwas höher als auf der Kontrolle PS war. Auf der Koll I/HA-

Matrix kam es wiederum zu einer gesteigerten Synthese von Ezrin gegenüber Koll I und um ca. ein Drittel mehr Ezrin-Synthese als auf PS. Auf Koll I/HA3.0 dagegen war die Expressionsrate von Ezrin im Gegensatz zu den anderen untersuchten Matrizes und PS am geringsten. Die Matrix mit der sulfatierten HA zeigte etwa die Hälfte der Ezrin-Menge im Vergleich zu Koll I/HA und etwa ein Drittel weniger Ezrin als auf der Kontrollmatrix Koll I.

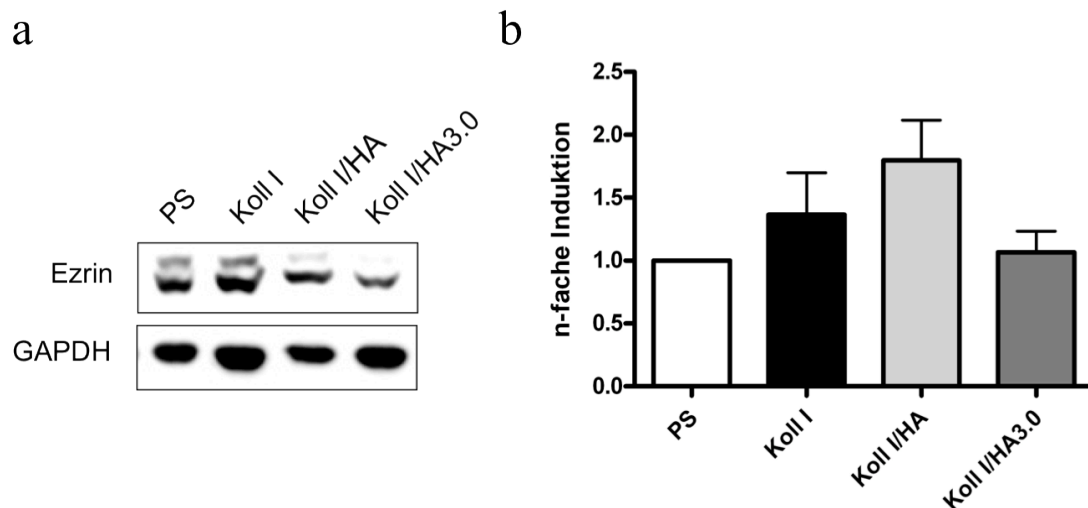


Abbildung 12: Expression von Ezrin durch die Fb nach der Kultur auf den Substraten, bzw. PS

Exemplarische Darstellung eines Western Blots des Proteins Ezrin (a) und zusammengefasste Quantifizierung der Proteinexpression von Ezrin in Abhängigkeit von den aEZM (n=6) (b).

Alles in allem zeigte sich durch die Zugabe von HA zu Koll I eine deutlich gesteigerte Ezrin-Synthese gegenüber den Kontrollmatrizes. Der Effekt der Zugabe von HA wurde jedoch durch die Sulfatierung der HA wieder aufgehoben. Es kam auf der sulfatierten Matrix sogar zu einer geringeren Expression von Ezrin als auf der Kontrolle Koll I.

3.3.3 PROTEINE DER FIBROBLASTENDIFFERENZIERUNG

In den späteren Phasen der Wundheilung differenzieren die Fb zu MFb mit einer hohen Matrixsynthesekapazität und der Fähigkeit die Wundränder durch Kontraktion zueinander zu bringen. Ohne die Beteiligung der MFb kann die Wundheilung nicht abgeschlossen werden. Um den Einfluss der aEZM auf die Differenzierung der Fb zu untersuchen, wurde das Protein α -SMA nach 5-tägiger Kultur der humanen dermalen Fb auf aEZM im Gesamtprotein isoliert und mit Western Blot nachgewiesen.

3.3.3.1 ALPHA-SMOOTH MUSCLE ACTIN

Das Protein α -SMA ist eine Aktin-Isoform, die typischerweise in vaskulären glatten Muskelzellen vorkommt (Darby et al. 1990; Skalli et al. 1989) und als Differenzierungsmarker der Fb zu MFb gilt (Gabbiani 2003). In den Experimenten der vorliegenden Arbeit zeigte sich im Western Blot eine zweifach signifikante Steigerung der Expression von α -SMA von auf Koll I/HA3.0 kultivierten Fb im Gegensatz zu den auf Koll I oder Koll I/HA kultivierten Zellen. Die Menge von α -SMA auf der Kontrolle PS lag ca. ein Drittel über dem Wert der Koll I- und der Koll I/HA-Matrix, während der α -SMA-Wert auf den Matrices Koll I und Koll I/HA ungefähr gleich war (siehe Abb. 13).

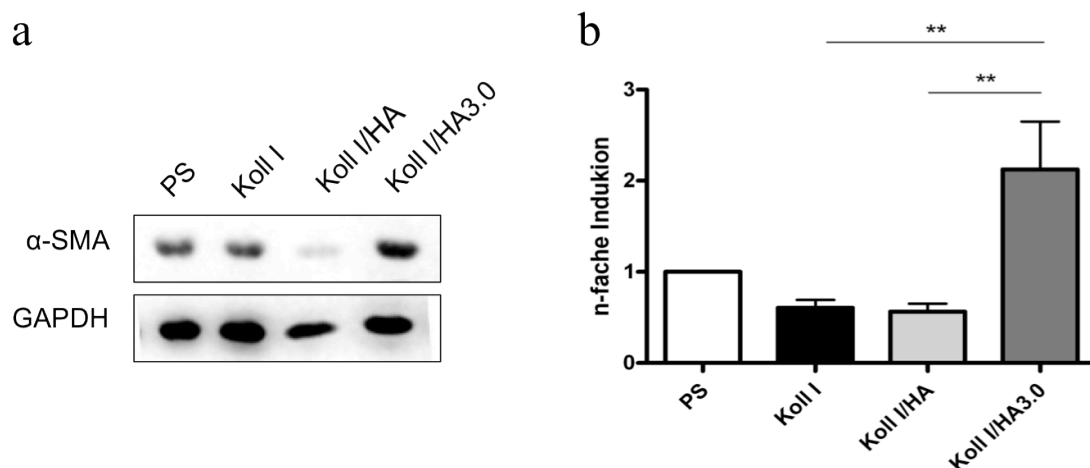


Abbildung 13: Expression von α -SMA durch die Fb nach der Kultur auf den Substraten, bzw. PS

Exemplarische Darstellung eines Western Blots des Proteins α -SMA (a) und zusammengefasste Quantifizierung der Proteinexpression von α -SMA in Abhängigkeit von den aEZM (n=6) (b).

Somit ließ sich nach der 5-tägigen Kultur der Fb auf den verschiedenen aEZM und PS ein deutlicher Einfluss der Sulfatierung von HA auf die α -SMA-Expression erkennen, während die Kombination von Koll I mit unsulfatierter HA keine Änderung der Expression des Differenzierungsmarkers α -SMA bewirkte.

4. DISKUSSION

4.1 GRUNDLAGE DER ARBEIT

Im Sonderforschungsbereich TRR67 werden neue funktionelle Biomaterialien auf aEZM-Basis hinsichtlich ihres Potentials für u. a. die Deckung großflächiger dermalen Wunden untersucht. Durch den Einsatz modifizierter GAG soll die Wundheilung verbessert und der Bildung von chronischen Wunden und hypertrophen Narben, bzw. Keloiden, vorgebeugt werden. Zu diesem Zweck wurden aEZM aus unsulfatierter, bzw. sulfatierter HA in Verbindung mit Koll I entwickelt und in den Untersuchungen den Kontrollen PS und Koll I gegenübergestellt.

Fibroblasten sind essentielle Zellen für den Ablauf der Wundheilung und werden in ihrer Funktion von der EZM beeinflusst. Daher ist die Überprüfung der Wirkung der hergestellten aEZM auf diese Zellen für die Prüfung der Biokompatibilität der neuen Biomaterialien unerlässlich. Im Rahmen des TRR67 wird der Einfluss der aEZM auf wichtige und für die Wundheilung relevante Fb-Funktionen in verschiedenen Arbeitsgruppen mit unterschiedlichen Methoden getestet.

Da die Untersuchung der Proteinexpression der Fb Rückschlüsse auf ihre Funktionen zulässt, untersuchte die Forschungsgruppe um Dr. Martin von Bergen-Tomm die Proteinexpression von auf aEZM kultivierten humanen dermalen Fb in einem Proteomweiten Ansatz mit der SILAC-Methode (Müller et al. 2012). Nach der Festlegung definierter Grenzwerte für eine signifikante Regulation der Proteinexpression von Fb nach 5-tägiger Kultur auf der sulfatierten aEZM im Vergleich zur unsulfatierten aEZM wurden in einer Cluster-Analyse die regulierten Proteine mit Hilfe der Datenbank PANTHER (Mi et al. 2005) hinsichtlich ihrer molekularen Funktionen bzw. biologischen Prozesse gruppiert.

In der vorliegenden Dissertation wurden im Rahmen der Arbeitsgruppe B4 des TRR67 die Ergebnisse der SILAC-Untersuchung verifiziert und dafür einige Proteine aus den drei als signifikant reguliert gefundenen Clustern ausgewählt und neben weiteren für die Fb-Funktion relevanten Proteinen mit den Methoden der Zymographie und des Western Blot untersucht.

Dabei standen drei wesentliche, für den Ablauf der Wundheilung in einem ausgewogenen Gleichgewicht notwendige Fb-Funktionen im Vordergrund. Dazu zählen

die Regulation des Matrixstoffwechsels durch die Fb, deren Fähigkeit zur Zell-Matrix-Interaktion und Regulation der Proliferation und nicht zuletzt die Differenzierung der Fb zu MFb.

Um die Ergebnisse im wissenschaftlichen Kontext bewerten zu können, wurden Kontrollexperimente durchgeführt und mögliche Fehlerquellen der Methoden der Zellkultivierung und des Western Blots in die Beurteilung der Daten einbezogen.

4.2 METHODENDISKUSSION

Biologisches System

Um den Einfluss der aEZM auf die Proteinexpression von Fb zu untersuchen, wurden primäre humane dermale Fb von gesunden Spendern verwendet. Im Gegensatz zur Nutzung immortalisierter Zelllinien ist es hierbei möglich, die Reaktionen der Zellen, welche noch vor kurzer Zeit durch das regulatorische Netzwerk ihres Ursprungsgewebes geprägt wurden, zu untersuchen. Andererseits kommt es bei der Verwendung von primären Zellen natürlicherweise zu einer biologischen Varianz, die sich beispielsweise in unterschiedlichen Proliferations- oder Genexpressionsraten ausdrücken kann. Um diese Varianz möglichst auszugleichen, wurden in der vorliegenden Arbeit für den Proteinnachweis mindestens n=6 Versuche durchgeführt. Außerdem wurde für jede mit aEZM beschichtete Zellkulturschale, sowie für die Kontrolle PS, die gleiche Zellzahl pro Fläche eingesetzt und die gleichen Kulturbedingungen und Inkubationszeiten verwendet.

Daher ist davon auszugehen, dass die Vorteile der Verwendung primärer Zellen über die damit einhergehenden Nachteile überwiegen.

Methodik

In der vorliegenden Arbeit wurden die zu untersuchenden Proteine vor allem mittels Western Blot und Immunodetektion nachgewiesen. Die Vorteile dieser Methode sind die relativ einfache Durchführung und die hohe Spezifität. Allerdings können auch hier durch die verschiedenen Arbeitsschritte Varianzen der Ergebnisse entstehen. Das Blotten stellt beispielsweise eine dieser möglicher Fehlerquellen dar. Der Transfer der Proteine erfolgt in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht unterschiedlich effektiv. Dem kann durch Modifikation des Blottingpuffers entgegengewirkt werden, um z. B. durch Änderung des Methanolgehalts den Transfer hochmolekularer Proteine zu

verbessern. Dies kann jedoch die Membranbindung kleinerer Proteine behindern, weshalb die optimalen Bedingungen als Kompromiss etabliert werden. Zudem können Blotzeit und Stromfluss, Probendegradation durch Überhitzen oder fehlerhafte Behandlung während des Probentransfers die Blottingresultate beeinflussen (Gressner & Arndt 2007). Trotz Beachtung der Fehlerquellen und Standardisierung der Parameter kam es bei den Experimenten dieser Arbeit während des Blottens zu einer nicht ganz vollständigen Übertragung der Proteine auf die Nitrozellulose-Membran. Dieses Phänomen beschränkte sich allerdings fast ausschließlich auf große Proteine (> 130 kDa). Da die hier untersuchten Proteine überwiegend ein kleineres Molekulargewicht aufwiesen und außerdem die Blottingzeiten verlängert wurden, war unter den vorliegenden Bedingungen nicht mit einer relevanten Beeinflussung der Ergebnisse zu rechnen. Auch die Durchführung von mindestens $n=6$ Versuchen für den Proteinnachweis sollte eine eventuelle Beeinflussung der Ergebnisse durch die unter Umständen unvollständige Übertragung der Proteine auf die Membran minimieren.

Versuchsbedingungen im Allgemeinen

Die möglichen Fehlerquellen jedes Teilschritts der Versuche, sei es die Probengewinnung, die Proteinquantifizierung, der Western Blot oder die Antikörperbindung und -detektion, beeinflussen schließlich die Messung. Anhand der Bande der GAPDH wurde die Reproduzierbarkeit der Detektion eines Referenz-Gens analysiert. Die GAPDH, ein Enzym der Glykolyse, wird allgemein als Referenz-Gen betrachtet. Das bedeutet, dass es unter verschiedenen Versuchsbedingungen konstant bleibt und daher ein stabiles Protein für die interne Kontrolle bei einem Western Blot von eukaryontischen Zellen ist (Wu et al. 2012). Somit wird es bei vielen Expressionsstudien auf RNA- und Proteinebene als nichtregulierte Referenz eingesetzt. In den Kontrollexperimenten dieser Arbeit zeigte sich, dass es trotz der beschriebenen Stabilität der GAPDH zu Schwankungen des Signals bei Parallelversuchen kam. Ursachen dafür könnten alle o. g. Variablen der Teilschritte der Versuche sein. Daher wurde festgelegt, dass das Referenz-Gen auf jeder Membran individuell mitgeführt und zur Auswertung herangezogen werden musste. Um insgesamt den Einfluss der Schwankungen so gering wie möglich zu halten, wurden für die Proteine, die mit der Methode des Western Blots nachgewiesen wurden, $n=6$ Versuche durchgeführt.

Des Weiteren wurde zu Beginn der Untersuchungen die GAPDH als Referenz-Gen überprüft, um auszuschließen, dass sie unter den gegebenen Versuchsbedingungen einer

Regulation unterworfen war. Es ließ sich zunächst kein Trend erkennen, welcher eine einheitliche Regulation der GAPDH durch die Matrizes vermuten ließ, weshalb die GAPDH auch unter den Bedingungen der Experimente dieser Dissertation als Referenz verwendet wurde.

Eine unter den Versuchsbedingungen der vorliegenden Arbeit aufgetretene Schwierigkeit bestand in der Lyse der Fb aus der Koll I/HA-Beschichtung. Da die Zellen auf dieser Matrix nach der Inkubation mit einem Zellschaber gelöst werden mussten, wobei auch die Beschichtung beschädigt wurde, könnten Bestandteile eben dieser bei der Proteinbestimmung mitbestimmt worden sein, was zu insgesamt weniger Lysatprotein in dieser Probe geführt hätte. Diese Hypothese wird durch die im Anschluss an alle Untersuchungen durchgeführte statistische Analyse aller GAPDH-Werte auf den unterschiedlichen Substraten unterstützt, wonach aus den Koll I/HA-Lysaten signifikant weniger GAPDH gegenüber sowohl der Koll I-, als auch der Koll I/HA3.0-Matrix detektiert wurde, obwohl gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden (siehe Abb. 14). Da jedoch immer der Quotient von Zielprotein und Referenzprotein bestimmt wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die geringere Lysatausbeute wenig Einfluss auf die quantifizierte Genexpression hatte.

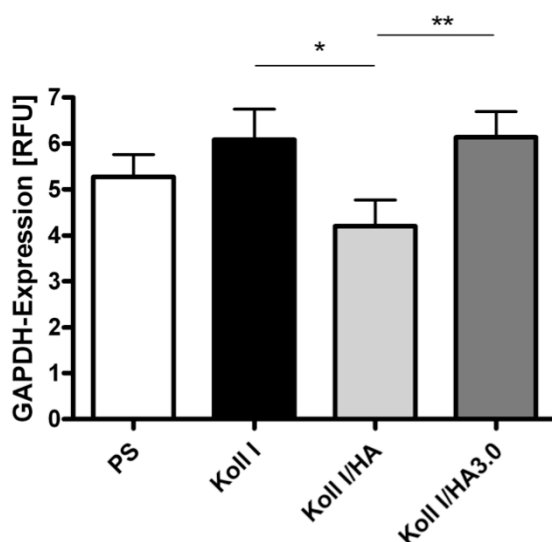


Abbildung 14: Darstellung aller GAPDH-Werte auf den Substraten, bzw. PS

Darstellung der statistischen Analyse aller absoluten GAPDH-Werte auf den unterschiedlichen Substraten (n=37), die y-Achse zeigt die GAPDH-Expression in den unterschiedlichen Zelllysaten in *relative fluorescence units* [RFU].

Im Großen und Ganzen muss eingeschätzt werden, dass die hier verwendete Untersuchungsmethode durchaus methodische und systematische Fehlerquellen enthält, deren Einfluss auf die Resultate durch experimentell exaktes Vorgehen, die strenge Standardisierung der Bedingungen und eine hohe Wiederholungsrate so gut wie möglich kompensiert werden konnte.

4.3 EINFLUSS DER aEZM AUF DIE FIBROBLASTENFUNKTION

Fibroblasten sind essentielle Zellen für die Wundheilung und interagieren eng mit der umgebenden Matrix. Daher ist es für die Entwicklung neuer funktionaler Biomaterialien auf der Basis von aEZM notwendig, diese hinsichtlich ihres Einflusses auf die Fb-Funktion zu überprüfen. Diese Informationen kann man durch die Untersuchung der Proteinexpression der Fb nach dem Kontakt mit der aEZM gewinnen.

Einfluss der aEZM auf den Matrixstoffwechsel

Biomaterialien sind resorbierbare Matrices, die von den residenten Fb effektiv besiedelt werden sollen, um durch die Synthese von matrixbildenden Proteinen den Gewebedefekt aufzufüllen (Dieckmann et al. 2010). Dabei kommt es zu verschiedenen Umbauprozessen der EZM, bei denen die von den Fb synthetisierten Proteine des Matrixstoffwechsels wichtige Schlüsselrollen spielen. Der Kollagenabbau wird dabei vor allem von MMP gewährleistet. Diese Gruppe verwandter Zn^{2+} -abhängiger Endopeptidasen katalysiert die Spaltung von Peptidbindungen in Proteinen (Agren et al. 2001). Bisher konnten aus der MMP-Familie 8 von 24 in Säugetieren bekannte Enzyme identifiziert werden (Gill & Parks 2008), die in den Stoffwechsel extrazellulärer Matrixproteine involviert sind (Agren 1994). Sie werden in der Regel als Proenzyme sezerniert und extrazellulär durch Abspaltung des Propeptids aktiviert (Fritsch 2004). In gesunder Haut ist das Expressionslevel der MMP sehr gering, es wird aber bei Hautverletzungen deutlich hochreguliert (Toriseva & Kähäri 2009). Die Hauptaufgabe der MMP ist neben dem Umbau der EZM (Gill & Parks 2008) auch die Prozessierung von bioaktiven Molekülen wie Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Chemokinen und ihren Rezeptoren (Gill & Parks 2008; Rodríguez et al. 2010; Page-McCaw et al. 2007). Dadurch ergeben sich diverse Funktionen, welche vermuten lassen, dass die MMP in jeden Schritt der Wundheilung involviert sind. Sie tragen so u. a. zur Beseitigung von Zelltrümmern, der initialen Ablösung der Keratinozyten von der Basalmembran, der Umwandlung der provisorischen Matrix und der Narbenbildung bei (Gill & Parks 2008;

Toriseva & Kähäri 2009). Außerdem beeinflussen die von den MMP proteolytisch gespaltenen Kollagene wiederum zelluläre Prozesse (Page-McCaw et al. 2007; Eckes et al. 2010). Inhibiert werden die MMP u. a. von vier verschiedenen spezifischen Inhibitoren, den TIMP, welche die Aktivität der MMP kontrollieren (Fritsch 2004). In den verschiedenen Phasen der Wundheilung kommt es daher zu bestimmten Kombinationen von MMP und TIMP (Madlener et al. 1998).

Die MMP lassen sich aufgrund ihrer Struktur und Substratspezifität in verschiedene Untergruppen einteilen, wie z. B. Gelatinasen (MMP-2, -9), Kollagenasen (z. B. MMP-1), Stromelysine (z. B. MMP-10) und membrangebundene MMP (MMP-14) (Fritsch 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurden MMP-2 und die membranständige MMP-14 hinsichtlich ihrer Expression durch die auf den aEZM kultivierten Fb untersucht. Matrixmetalloproteinase-2 wurde dabei im Gegensatz zu den Kontrollen sowohl durch den Einfluss unsulfatierter HA, als auch durch die sulfatierte HA signifikant herunterreguliert (siehe 3.3.1.1).

Das Enzym MMP-2 (Gelatinase A) wurde 1981 von Seltzer *et al.* das erste Mal in humanen dermalen Fb beschrieben (Seltzer et al. 1981). Sie verstoffwechselt hauptsächlich denaturiertes Kollagen (Gelatine), Laminin und Koll VI, die Hauptkomponente von Basalmembranen. Andere Substrate von MMP-2 sind Koll IV, V und VII, welche alle in der Haut vorkommen (Agren 1994). Matrixmetalloproteinase-2 wird typischerweise von aktivierten Fb, z. B. durch eine Gewebeverletzung, exprimiert und hat einen positiven Einfluss auf die Zellmigration (Howard et al. 2012), die vor allem in den frühen Stadien der Wundheilung relevant ist. Des Weiteren verringert MMP-2 die Entzündungsreaktion während der Wundheilung, indem es proinflammatorische Zytokine durch Spaltung inaktiviert (Page-McCaw et al. 2007). Außerdem kann MMP-2 TGF- β_1 aktivieren (Wu & Derynck 2009; Yu & Stamenkovic 2000). Es ist nach wie vor unklar, wie die Expression von MMP-2 reguliert ist. Es scheint aber einen engen Zusammenhang zwischen der Umwandlung zu einem kontraktilen Phänotyp und der Herunterregulation von MMP-2 zu geben und anders herum. Howard *et al.* konnten zeigen, dass die Veränderungen der mechanischen Eigenschaften von Zellen die MMP-2 Expression durch einen bisher unverstandenen Mechanismus regulieren können (Howard et al. 2012). Außerdem wird die Expression und Aktivierung von MMP-2 durch HA gesteigert (Isnard et al. 2001). Da sich die

Menge von MMP-2 trotz der Addition von HA in die Matrix nicht steigerte, schien in diesem experimentellen Ansatz der induktive Einfluss von HA auf die MMP-2-Synthese keine effektive Wirkung zu haben. Gleichwohl zeigte sich ein deutlicher Einfluss der modifizierten HA auf die MMP-2-Synthese im Sinne einer signifikanten Verminderung der MMP-2-Menge durch die sulfatierte HA. Diese Ergebnisse werden auch von der Proteomanalyse gestützt (Müller et al. 2012).

Matrixmetalloproteinase-14, auch bezeichnet als MT1-MMP (*membrane type 1-MMP*), wurde 1994 von Sato *et al.* als erste membrangebundene MMP identifiziert (Sato et al. 1994). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten eine signifikante Induktion der Synthese dieser Proteinase auf der Matrix aus Koll I und nativer HA (Koll I/HA) gegenüber der Kontrolle Koll I. Das Einbringen sulfatierter HA in die aEZM führte zu einer Reduktion der Synthese von MMP-14 auf das Niveau der Kontrolle Koll I. Dies entspricht auch den Ergebnissen der SILAC-Untersuchung (Müller et al. 2012).

Matrixmetalloproteinase-14 ist in der Zellmembran verankert (Egeblad & Werb 2002) und wird im Gegensatz zu den meisten anderen MMP durch Furin oder furinähnliche Proteasen aktiviert (Nagase & Woessner 1999). Sie trägt u. a. zur Regulierung von Zellmotilität, -proliferation und -differenzierung bei (Holmbeck et al. 2004). Ein wichtiges Substrat dieser Proteinase ist Koll I, daneben verstoffwechselt sie weitere Komponenten der EZM wie Laminine, Integrine, CD44H und Zytokine wie Interleukin-8 (IL-8) (Sato et al. 2005). Als Zelloberflächenrezeptor bindet MMP-14 TIMP-2 (Strongin et al. 1995) und kann in diesem Komplex proMMP-2 zu aktivem MMP-2 spalten (Nagase 1998). In der Wundheilung bilden diese Komponenten ein kompliziertes Netzwerk für den Kollagenabbau (Lee et al. 2006). Die Verringerung von MMP-14 auf der sulfatierten Matrix könnte daher durch die geringere Aktivierung von proMMP-2 eine Erklärung für die hier ebenso geringere Menge von aktiver MMP-2 sein. Da die Regulation der beiden Proteasen auf der unsulfatierten aEZM jedoch nicht identisch war, scheint dies nicht der einzige Grund für die Reduktion von MMP-2 zu sein.

Durch die fibrinolytische und kollagenolytische Aktivität kontrolliert und induziert MMP-14 die Migration von Fb durch die kollagene Matrix (Sabeh et al. 2004). Nicht zuletzt aktiviert MMP-14 TGF- β_1 (Atkinson et al. 2007), interagiert mit CD44 (Mori et al. 2002) und stimuliert dadurch weitere wichtige Zellfunktionen wie z. B. die Differenzierung.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der Arbeit, dass der Einfluss von HA-Derivaten in den aEZM nicht zu einer vermehrten Expression von MMP führte. Dies lässt vermuten, dass es durch den Einsatz von Biomaterialien mit sulfatierter HA nicht zu einem übermäßigen Koll-Abbau, bzw. zu einem moderaten Matrix-Remodeling kommen würde, während gleichzeitig andere, für die Wundheilung wichtige Funktionen der MMP, wie die Förderung der Zellmigration oder der negative Einfluss von MMP-2 auf die Entzündungsreaktion, durch die trotzdem ausreichende Menge der MMP auf den Matrices weiterhin stattfinden könnten.

Trotz dieser zahlreichen positiven und wichtigen Funktionen der MMP im Laufe der Wundheilung kommt es jedoch, wie bereits in Abschnitt 1.2.3 beschrieben, in der Pathogenese von chronischen Wunden zu einer Imbalance degradativer MMP und deren Inhibitoren, den TIMP (Bullen et al. 1995; Toriseva & Kähäri 2009). Dies führt neben anderen Faktoren zu einer Stagnation der Wundheilung in der Phase der Entzündung. Es wurde beispielsweise MMP-1 in Fb und Keratinozyten und MMP-2, -3, -9, -10 und MMP-11 in Fb aus chronischen Wunden erhöht gefunden (Yager & Nwomeh 1999). Außerdem sprechen eine erhöhte Expression von MMP-1 und auch eine vermehrte Aktivierung von proMMP-2 für einen sog. „inflammatorischen“ Phänotyp der Fb (Eckes et al. 2006). Es ist daher davon auszugehen, dass eine vermehrte Expression von MMP auf ein inflammatorisches Wundmilieu hinweist. Auch die fibrotischen Wundheilungsstörungen zeigen eine veränderte Proteasen-Zusammensetzung. In Keloid-Fb sind z. B. sowohl MMP-1, als auch MMP-2 und TIMP-2 hochreguliert (Fujiwara et al. 2005). Die Verringerung der MMP-Expression in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit sprechen daher dafür, dass die sulfatierte Matrix kein inflammatorisches Milieu fördert. Diese Vermutungen werden auch von van der Smissen *et al.* und den Ergebnissen der SILAC-Analysen bestätigt (van der Smissen et al. 2011; Müller et al. 2012).

In der klinischen Praxis werden bereits therapeutische Wundauflagen angewendet, welche die Reduktion von MMP zur Folge haben. Ein Beispiel ist Promogran® aus oxidiert regenerierter Zellulose und Koll, welches die Proteasen bindet und inaktiviert (Cullen et al. 2002).

Eine wichtige Anforderung an funktionelle Biomaterialien ist die Förderung natürlicher Zellfunktionen und Wundheilungsprozesse (Williams 2009). Fibroblasten bauen nicht nur EZM ab, sondern synthetisieren selbst den Hauptteil der Matrix wie Koll und GAG.

In der vorliegenden Dissertation wurden die Kollagene I und VI für die Untersuchung der Syntheseleistung der Fb während der Wundheilung ausgesucht. Kollagen I ist das häufigste Protein in Sehnen, Bändern, Knochen (> 90 % der organischen Masse), der Haut und der Kornea, sowie weiterer Organe (Gelse et al. 2003). In der vorliegenden Dissertation war die Koll I-Expression durch den Einfluss der sulfatierten Matrix gegenüber den Kontrollen und der unsulfatierten aEZM leicht erhöht. Die Ergebnisse der Expression von Koll I stehen insofern im Gegensatz zu früheren Versuchen, als dass sowohl in den SILAC-Untersuchungen, als auch bei van der Smissen *et al.* Koll I auf der sulfatierten Matrix geringer exprimiert war (van der Smissen et al. 2011). Jedoch wurde der Western Blot bei van der Smissen *et al.* nach 48-stündiger Kultur der Fb auf den aEZM durchgeführt, während die Kultur der Fb bei den Experimenten der vorliegenden Arbeit 5 Tage dauerte. Da die Kollagenexpression der Fb stark von ihrer Konfluenz abhängt (Dr. Ulf Anderegg, persönliche Mitteilung) kann es allein durch die Länge der Fb-Kultur zu einer Erhöhung der Koll I-Expression durch die Fb auf der sulfatierten Matrix kommen.

Eine Verfälschung der Western Blot-Daten durch eventuelle Kreuzreaktivitäten des verwendeten primären Anti-Koll I-Antikörpers mit dem in der Kulturbeschichtung enthaltenen Ratten-Koll I wurde im Rahmen der Untersuchungen nicht bestätigt. Sowohl in zellfreien Proben aus beschichteten Kulturgefäßen, als auch in Immunofluoreszenzfärbungen von Zellen auf diesen Beschichtungen konnte eine unspezifische Antikörperbindung an die Matrix gemäß dem Datenblatt der Hersteller ausgeschlossen werden (nicht gezeigt).

Kollagen I gehört zur Gruppe der fibrillären Kollagene (Koll I, II, III, V und XI) (Gelse et al. 2003). Es gibt dem Gewebe als Hauptbestandteil der dermalen Matrix Zugfestigkeit und ersetzt zerstörtes dermales Gewebe (Vedrenne et al. 2012). In den späten Phasen der Wundheilung wird Koll I durch MFb produziert (Hinz 2007). Das Koll III-reiche primäre Granulationsgewebe wird so in ein Koll I-reiches Narbengewebe umgebaut (Welch et al. 1990). Die trippelhelikalen Fasern befinden sich meist in einem Verbund mit entweder Koll III (in der Haut und retikulären Fasern) (Fleischmajer et al. 1990) oder Koll V (in Knochen, Sehnen und Kornea) (Niyibizi & Eyre 1989). Da Koll I von MMP-14 verstoffwechselt wird (Sato et al. 2005), könnte die auf der sulfatierten aEZM verringerte Menge von MMP-14 zu einer Erhöhung von Koll I führen.

Allerdings kann diese Hypothese durch den Vergleich der Expressionsmengen auf der unsulfatierten Matrix nicht unterstützt werden.

Ein weiteres von den Fb synthetisiertes Protein ist Koll VI, welches in den meisten interstitiellen Bindegeweben vorkommt (von der Mark et al. 1984) und 1976 das erste Mal von Chung *et al.* beschrieben wurde (Chung et al. 1976). Die Synthese von Koll VI wird stark von TGF- β_1 induziert (Schnoor et al. 2008).

Kollagen VI ist ein Bestandteil der kollagenreichen provisorischen Matrix. Es bildet ein unabhängiges mikrofibrilläres Netzwerk in fast allen Bindegeweben außer dem Knochen (von der Mark et al. 1984; Keene et al. 1988) und verleiht dem Gewebe Festigkeit. Durch die Fähigkeit der Interaktion sowohl mit Strukturen der EZM, als auch mit Oberflächenrezeptoren von Zellen kann Koll VI Strukturen des Bindegewebes miteinander verankern (Schnoor et al. 2008). Die Koll VI-Mikrofibrillen legen sich z. B. um andere Kollagenfibrillen, vernetzen Koll I und III miteinander (Bonaldo et al. 1990) und binden diese an die umgebende HA. Außerdem kann Koll VI das Proliferations-, Migrations- und Differenzierungsverhalten von Zellen durch die Bindung an zelluläre Rezeptoren beeinflussen (Aumailley et al. 1991; Atkinson et al. 1996; Knupp & Squire 2001). Auch für Koll VI zeigt sich eine geringe Steigerung der Expression durch den Einfluss der HA-Derivate, wobei die sulfatierte HA, wie auch in den vorangegangenen Proteomanalysen, die höchsten Expressionsraten zeigte.

Die Expression von Koll VI ist auch von der Dichte der Zellen abhängig. Es wird von konfluenten dermalen Fb exprimiert, um eine geeignete Zellumgebung herzustellen (Hatamochi et al. 1989). Da es in den Experimenten der vorliegenden Arbeit keine signifikante Veränderung der Expression von Koll VI auf den aEZM gab, ist davon auszugehen, dass die Fb auf der einen Seite eine ähnliche Konfluenz aufwiesen, es aber gleichzeitig zu keiner übermäßigen Matrixproduktion auf der sulfatierten aEZM kam.

Alles in allem sprechen die Ergebnisse der Untersuchung der Syntheseleistung der Fb dafür, dass es durch den Einbau von HA-Derivaten in aEZM nicht zu einer Beeinträchtigung der Synthesefunktion der Fb kommt. Gleichzeitig steht zu vermuten, dass keine übermäßige Matrixproduktion durch die Fb unmittelbar induziert wird und somit das Risiko von fibroproliferativen Wundheilungsstörungen durch diese aEZM gering wäre. Gleichzeitig kann von Zellkulturen mit einer Zellart nicht unmittelbar auf

den Nettoeffekt im Gewebe mit den zu erwartenden parakrinen Mechanismen extrapoliert werden.

Auch andere Proteine übernehmen wichtige Funktionen für den Matrixstoffwechsel, wie z. B. TSP-1. Es gehört zu den matrizellulären Proteinen, einer Gruppe verschiedener nicht verwandter, aber funktionell ähnlicher Glykoproteine, die u. a. der Vermittlung von Zell-Matrix-Interaktionen dienen (Bornstein 1995). Sie werden vor allem während der Entwicklung, dem Wachstum und als Antwort auf Verletzungen exprimiert und sind grundsätzlich im normalen erwachsenen Gewebe nur in geringem Maße vorhanden (Bornstein 2001). Thrombospondine sind eine Familie von fünf verwandten extrazellulären Ca^{2+} -bindenden Glykoproteinen, die aufgrund ihrer Struktur in die Subfamilien A (TSP-1 und -2) und B (TSP-3, -4, -5) unterteilt werden (Adams 2001). Sie bestehen aus verschiedenen Domänen und können daher mit einer Vielzahl verschiedener Zelloberflächenrezeptoren interagieren (Adams 2001). Da jeder Zelltyp ein individuelles Repertoire von Rezeptoren aufweist, sind die Eigenschaften der TSP stark von ihrem Bindungspartner abhängig. Thrombospondin-1 wurde in Assoziation mit Thrombozyten in den frühen siebziger Jahren als erstes Protein dieser Familie entdeckt (Baenziger et al. 1971) und später von Lawler *et al.* als Glykoprotein charakterisiert (Lawler et al. 1978). Neu synthetisiertes TSP-1 wird in die EZM integriert oder bindet an die Zelloberfläche, wo es schnell internalisiert und abgebaut wird (McKeown-Longo et al. 1984).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Expression von TSP-1 durch die Fb-Kultur auf einer aEZM aus Koll I und HA gegenüber den Kontrollen stieg. Allerdings war dieser Effekt durch den Austausch von nativer HA durch sulfatierte HA wieder rückläufig. Die Ergebnisse der sulfatierter aEZM zeigten eine mäßige Reduktion der Proteinexpression gegenüber den Kontrollen PS und Koll I.

Thrombospondin-1 scheint in alle Stadien der Wundheilung involviert zu sein und interagiert mit allen an der Wundheilung beteiligten Zellen (Esemuede et al. 2004). Die Expression von TSP-1 ist am ersten Tag der Wundheilung am höchsten und fällt danach kontinuierlich ab (Bornstein 2001). Die Hauptquellen dieses Proteins scheinen zunächst Thrombozyten und später Makrophagen zu sein, die vor allem in den ersten Wundheilungsstadien anwesend sind (Bornstein 2001). Thrombospondin-1 ist teilweise verantwortlich für die initiale Migration von u. a. Makrophagen ins Wundgebiet (Esemuede et al. 2004). Große Mengen von TSP-1 in den späteren Phasen der

Wundheilung können jedoch die Angiogenese und Fb-Funktion beeinträchtigen (Esemuede et al. 2004). Streit *et al.* zeigten, dass die Überexpression von TSP-1 zu einer verringerten Wundheilung durch weniger Granulationsgewebe und Angiogenese führte. Außerdem war die Fb-Migration in das Wundbett vermindert (Streit et al. 2000). Die verringerte Expression von TSP-1 auf der sulfatierten Matrix würde somit die Fb-Migration in das Wundgebiet und damit die Besiedelung des Biomaterials indirekt fördern. Die geringere TSP-1-Expression auf der sulfatierten aEZM stärkt außerdem die Hypothese, dass die sulfatierte aEZM keine entzündlichen Signale fördert, welche die Wundheilung beeinträchtigen könnten.

Durch die Interaktion von TSP-1 mit verschiedensten Mediatoren, Matrixkomponenten wie PG, Kollagenen und Fibronectin oder mit Integrinen (Chen et al. 2000; Adams 1997) ist es an der zellulären Antwort auf dieselben beteiligt (Adams 2001). Dies geschieht z. B. über die Interaktion mit Signalkaskaden wie dem *extracellular signal-related kinase* (ERK)-Signalweg, den es im ungebundenen Zustand inhibiert. Der ERK-Signalweg kontrolliert als Antwort auf Hormone, Wachstumsfaktoren und Zytokine Zellfunktionen wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose (Peyssonnaud & Eychène 2001). Thrombospondin-1, welches TGF- β_1 gebunden hat, kann den ERK-Signalweg nicht hemmen und fördert somit indirekt die genannten Zellfunktionen. Früher gezeigte proliferationsfördernde Eigenschaften von hochsulfatierter HA (van der Smissen et al. 2011) könnten demnach auch auf eine verminderte TSP-1 Expression von auf dieser Matrix kultivierten Fb zurückzuführen sein.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der Expression von TSP-1 auf der sulfatierten aEZM, dass von migrations- und proliferationsfördernden Eigenschaften der sulfatierten aEZM ausgegangen werden kann und dass durch diese Matrix scheinbar kein entzündliches Milieu gefördert wird.

Die aus der Analyse des Matrixstoffwechsels der kultivierten Fb gezogenen Schlüsse werden auch von den Ergebnissen von van der Smissen *et al.* bestätigt, die u. a. sowohl eine Erhöhung der Proliferation, als auch eine Abnahme von MMP-1 und eine geringere Menge der HA-Synthetase 2 (HAS2), der wichtigsten HA-Synthetase von dermalen Fb in Zellkultur (Averbeck et al. 2007) zeigten (van der Smissen et al. 2011).

Einfluss der aEZM auf die Zell-Matrix-Interaktion und die Regulation der Proliferation

Während der Wundheilung kommunizieren und interagieren Zellen und EZM über verschiedene Wege miteinander, wie z. B. über lösliche Mediatoren oder membranständige Adhäsionsproteine. Zu diesen Adhäsionsproteinen gehört CD44, ein Oberflächenrezeptor für HA. Er wurde 1992 als erster Rezeptor für HA beschrieben (Underhill 1992). Als ubiquitäres, multistrukturelles und -funktionales Zelloberflächenprotein wird CD44 u. a. auf Fb exprimiert (Martin et al. 2003; Kakehi et al. 2003) und gehört zu einer Gruppe Typ-1-transmembraner Glykoproteine (Martin et al. 2003). Die Standardform der aus alternativem Spleißen eines einzelnen Gens (Screaton et al. 1992) und posttranslationaler Modifikation entstehenden Proteine wird als CD44s (CD44H) bezeichnet (Martin et al. 2003; Wolny et al. 2010). CD44 besteht aus einem transmembranen und einem zytoplasmatischen Teil, der mit diversen zytoskelettalen Proteinen interagiert, darunter Aktin, Ankyrin oder Mitglieder der ERM-Familie zur Verankerung des Proteins in der Zelle (Martin et al. 2003). Im Laufe der Wundheilung spielt CD44 durch seine Interaktion mit HA und diversen anderen Substraten eine wichtige Rolle. CD44 ist sowohl an der Aufnahme, als auch am Auf- und Abbau von HA im Rahmen des Remodelings beteiligt (Underhill 1992) und trägt so schließlich zu einer stabilen dreidimensionalen Zell-EZM-Verbindung bei. Die Interaktion von CD44 und HA hat einen proproliferativen Effekt auf beteiligte Zellen. Hyaluronsäure beeinflusst z. B. das Wachstum von Bindegewebszellen mit gleichzeitig erhöhter Zelldifferenzierung (Nehls & Hayen 2000; Slevin et al. 2007). Yoneda *et al.* zeigten in einer experimentellen *in vitro*-Studie, dass die exogene Zugabe von HA zu einer dermalen Fb-Kultur die Zellzahl auf über 20 % erhöht (Yoneda et al. 1988). Außerdem zeigten Wang *et al.* eine erhöhte Fb-Aktivität mit Stimulation der Kollagensynthese durch eine dermale Injektion quervernetzter HA (Wang et al. 2007). Gleichzeitig ist CD44 auch an der kontaktabhängigen Regulation der Proliferation von Zellen beteiligt. Dabei steht es intrazellulär über Proteine der EZM-Familie in Kontakt mit dem Protein Merlin, das bei geringer Zelldichte im phosphorylierten Zustand vorliegt und Zellwachstum und -proliferation zulässt. Bei hoher Zelldichte kommt es jedoch HA- und CD44-vermittelt zu einer Dephosphorylierung von Merlin und somit zu einer Hemmung des Zellwachstums (Morrison et al. 2001).

In den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zeigte sich keine signifikante Veränderung der Expression von CD44 auf den unterschiedlichen Matrices. Aus den Funktionen von

CD44 während der Wundheilung lässt sich daher ableiten, dass die Proliferation der Fb durch den Einfluss der sulfatierten HA in der aEZM nicht gehemmt würde, während gleichzeitig kein übermäßiges Matrix-Remodeling zu erwarten wäre.

In der frühen inflammatorischen Phase der Wundheilung kommt es zu einer Anhäufung von HA und CD44. Es erfolgt CD44-abhängig eine erleichterte Migration von Entzündungs- und anderen Zellen ins Wundgebiet (Chen & Abatangelo 1999). Dabei kann HA die Entzündung aber auch durch spezifische Interaktionen mäßigen und kontrollieren (Morra 2005). Diese teilweise gegensätzlichen Aktivitäten von HA erklären sich durch seine variable molekulare Größe mit unterschiedlichen biologischen Funktionen (Morra 2005). Das spätere Granulationsgewebe zeigt sich ebenso reich an HA (Weigel et al. 1988). Am Ende der Wundheilung nimmt die Expression von CD44 und HA wieder bis auf das Ausgangsniveau ab. Die unveränderte Expression von CD44 auf den verglichenen Wachstumssubstraten spricht dafür, dass auch die Sulfatierung von HA die Fb nicht übermäßig zu aktivieren oder einen „entzündlichen“ Phänotyp zu fördern scheint, was wiederum dem Einsatz als Biomaterial zuträglich wäre.

Ein weiteres Protein der Zell-Matrix-Interaktion und der Regulation der Proliferation ist das Protein Ezrin, ein Mitglied der ERM-Proteinfamilie. Es ist dessen erstes identifiziertes Mitglied und wurde das erste Mal als Komponente von Mikrovilli beschrieben (Bretscher 1983). ERM-Proteine haben ähnliche Funktionen und befinden sich vor allem in aktinreichen Oberflächen-Strukturen wie Mikrovilli, Membranfalten und Filopodien (Martin et al. 2003). Ihre Hauptaufgabe besteht in der Formierung und dem Aufrechterhalten dieser Aktin-basierten Zelloberflächenstrukturen (Bretscher 1999) und der Vermittlung und Verbindung zwischen Molekülen der Plasmamembran wie CD44 und ICAM-2 und dem Zytoskelett (Yonemura et al. 1999). Das Zytoskelett übernimmt viele dynamische Funktionen wie die Bestimmung der Zellmorphologie, die Anlagerung an andere Zellen und die EZM durch Adhäsionsmoleküle und die Herstellung und Aufrechterhaltung von Zellpolarität. Gleichzeitig nimmt es an endo- und exozytotischen Transportprozessen der Membran, an Zellmigration und Teilung sowie an der transmembranen Signalübermittlung, der Wachstumskontrolle und der Differenzierung teil (Bretscher 1999). Ezrin kommt in den meisten Zelltypen in latenter Form vor (Martin et al. 2003) und wird durch verschiedene Mechanismen aktiviert (Granés et al. 2000). Neben den allgemeinen Funktionen der ERM-Proteine wurden Ezrin einige spezifischere Aufgaben innerhalb der Verknüpfung des Zytoskeletts mit

der Plasmamembran zugeschrieben. So wurde es z. B. in den Führungskanten sich ausbreitender Zellen gefunden, was auf seine Beteiligung an der Zellmotilität schließen lässt (Hiscox & Jiang 1999). Außerdem ist Ezrin in verschiedene Signalkaskaden involviert und beteiligt sich an diversen Prozessen wie Zelladhäsion, T-Zell-Aktivierung und der Sortierung von Membranproteinen (Chen et al. 2000).

Unter den Untersuchungsbedingungen dieser Arbeit konnte eine gesteigerte Expression von Ezrin auf der Koll I/HA-Matrix gezeigt werden, die durch die Sulfatierung der HA wieder rückgängig gemacht wurde und so in etwa dem Wert der Kontrolle PS entsprach. Diese Ergebnisse unterstützen durch die enge Verbindung der Funktionen von CD44 und Ezrin den Trend, der auch in den Daten für CD44 ersichtlich war und zeigen, dass aEZM mit sulfatierter HA aktive und für die Wundheilung wichtige Zellprozesse wie Adhäsion und Migration nicht behindern sollte.

Proteine der Fibroblastendifferenzierung

Wie bereits unter 1.2.2 beschrieben, durchlaufen die Fb während der Wundheilung einige wichtige phänotypische Änderungen. Eine davon ist die Differenzierung der Fb in den sog. synthetisierenden Phänotyp (Eckes et al. 2006). Diese MFb werden durch einen kontraktilem Apparat ähnlich dem von glatten Muskelzellen (Gabbiani et al. 1971) und durch die Neu-Expression des Proteins α -SMA charakterisiert (Darby et al. 1990). Dieses Protein ist eine für vaskuläre glatte Muskelzellen typische Aktin-Isoformen (Skalli et al. 1989; Darby et al. 1990), die in den meisten Zellen, deren Hauptfunktion die Kontraktion ist, vorkommt (Darby et al. 1990). Aktine sind Strukturproteine, die als Bestandteil des Zytoskeletts in dynamischen Filamenten, sog. Aktinfilamenten, angeordnet sind (Pschyrembel 2007). In eukaryontischen Zellen finden sich mindestens 6 Aktin-Isoformen, die sich anhand ihres isoelektrischen Punktes in α -Aktine in Muskelzellen und β - und γ -Aktine in Nicht-Muskelzellen unterteilen lassen (Herman 1993).

Die Anwesenheit des während der Wundheilung hochregulierten Proteins Endothelin-1 kann die Expression von prokontraktilen Proteinen, wie vor allem α -SMA, aber auch Proteinen der ERM-Familie oder Paxillin in Fb fördern (Shi-Wen et al. 2004) und somit die Kontraktion und Migration von MFb (Guidry & Hook 1991; Appleton et al. 1992) vorantreiben. Ein weiterer wichtiger Regulator der Differenzierung von Fb zu MFb ist TGF- β_1 . Durch die Bindung an dessen Zellrezeptor werden Phosphorylierungskaskaden

ausgelöst, die zu einer Transkriptionssteigerung des α -SMA-Gens führen (Wipff et al. 2007). Durch den aktivierten und Matrix-produzierenden Phänotyp der MFb kommt es in den späten Phasen der Wundheilung zur Matrixumwandlung (Shi-Wen et al. 2004) und Gewebekontraktion (Hinz 2007) bis zur Entstehung einer Narbe.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine signifikante Hochregulation von α -SMA auf der sulfatierten aEZM, welches für eine starke Differenzierung der Fb in MFb spricht. Infolgedessen würde man durch den Einfluss der HA-Derivate eine erhöhte Matrixproduktion und –umwandlung durch die MFb erwarten. Diese Ergebnisse sind jedoch sorgfältig zu betrachten, da sie im Gegensatz zu anderen Untersuchungen stehen, in denen sich bei der Kultur auf sulfatierter aEZM keine vermehrte Differenzierung von Fb zu MFb zeigte (van der Smissen et al. 2011). Allerdings wurden die Untersuchung der Fb in den vorangegangenen Versuchen nach 48-stündiger Kultur auf sulfatierter aEZM durchgeführt, während die Fb unter den Versuchsbedingungen dieser Arbeit 5 Tage Zeit hatten sich zu MFb umzuwandeln. Dies könnte sowohl eine Erklärung für die deutlich erhöhte Expression von α -SMA, als auch für die vermehrte Koll I-Expression auf der sulfatierten Matrix sein. Auf der anderen Seite spricht die moderate Erhöhung von Koll I in den Ergebnissen dieser Arbeit trotz starker Umwandlung der Fb in MFb nicht für eine übermäßige Matrixproduktion durch diesen Phänotyp. Auch die Daten der anderen untersuchten Proteine, wie MMP-2 und -14 und CD44 und Ezrin sprechen gegen ein erhöhtes Matrix-Remodeling auf der sulfatierten Matrix.

Alles in allem weisen die Ergebnisse der Expressions-Untersuchung des Proteins α -SMA zwar auf eine erhöhte Umwandlung der Fb zu MFb durch den Einfluss der sulfatierten HA in der aEZM hin, trotzdem kam es scheinbar auf dieser Matrix nicht zu einer massiven Produktion von nativer Matrix durch die Fb oder zu einem übermäßigen Matrix-Remodeling.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades *Dr. med.*

Einfluss von modifizierter extrazellulärer Matrix auf die Proteinexpression von Fibroblasten

eingereicht von

Margarete Freiin von Feilitzsch

angefertigt an

der medizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie

betreut von

PD Dr. rer. nat. habil. Ulf Anderegg

Juni 2014

Die physiologische Wundheilung ist ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Zellen und extrazellulärer Komponenten. Dermale Fb stellen dabei eine der wichtigsten Zellpopulationen dar. Bei Störungen dieses fein regulierten Gleichgewichts kann es zu chronischen Wunden oder Wundheilungsstörungen kommen. Die Entwicklung von Biomaterialien auf Basis von aEZM mit sulfatierter HA bietet daher einen vielversprechenden Ansatz, um Wunddeckungsverfahren zu entwickeln, welche die natürlichen Zellfunktionen und Wundheilungsprozesse fördern. Um die Biokompatibilität der Materialien zu überprüfen, wurden in dieser Arbeit humane dermale Fb nach 4-tägiger, bzw. 5-tägiger Kultur auf aEZM mit unsulfatierter und sulfatierter HA, sowie den Kontrollen PS und Koll I mittels Zymographie, bzw. Western Blot hinsichtlich ihrer Proteinexpression untersucht. Der Western Blot zeigte tatsächlich methodische und systematische Fehlerquellen, deren Einfluss auf die Resultate durch exaktes Vorgehen, strenge Standardisierung der Bedingungen und eine hohe Wiederholungsrate so gut wie möglich kompensiert werden sollte. Auch das Referenz-Gen GAPDH sollte für jede Probe individuell mitgeführt und zur Auswertung herangezogen werden. Außerdem sollte kritisch überprüft werden, ob die GAPDH für den geplanten Versuchsaufbau als Referenz-Gen geeignet ist, was bei dieser Arbeit

jedoch zutraf. Die Proteinexpression der auf den unterschiedlichen Matrices kultivierten Fb erlaubte schließlich Rückschlüsse auf für die Wundheilung relevante Fb-Funktionen. Durch den Einfluss der sulfatierten HA kam es trotz vermehrter Umwandlung von Fb in MFb zu einem geringeren Kollagenabbau bei mäßiger Syntheseleistung und moderatem Matrix-Remodeling. Die Ergebnisse sprechen für eine Förderung des proliferativen Phänotyps der Fb, Ermöglichen der Fb-Migration und gegen ein inflammatorisches Milieu auf der sulfatierten Matrix. Diese Datenlage unterstützt die Ergebnisse der Proteom-Analyse, die einen hemmenden Effekt der sulfatierten HA auf die Expression von MMP und andere EZM-assoziierte Proteine, die am Matrix-Remodeling beteiligt sind, zeigten und daher eine gute Biokompatibilität der sulfatierten HA erwarten lassen. Alles in allem sprechen die Daten dieser Untersuchungen dafür, dass durch den Einsatz von Biomaterialien mit aEZM aus nativem Koll und sulfatierter HA das Risiko der Entstehung von chronischen Wunden und fibroproliferativen Wundheilungsstörungen vermindert sein könnte und es daher lohnenswert wäre, diese Vermutungen durch *in-vivo*-Untersuchungen zu überprüfen.

LITERATURVERZEICHNIS

- Aarabi S, Longaker M T, Gurtner G C. Hypertrophic scar formation following burns and trauma: new approaches to treatment. *PLoS med* 2007; 4(9):e234.
- Adams J C. Thrombospondin-1. *Int J of Biochem Cell Biol* 1997; 29(6):861–5.
- Adams J C. Thrombospondins: multifunctional regulators of cell interactions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17:25–51.
- Agren M S. Gelatinase activity during wound healing. *Br J Dermatol* 1994; 131(5):634–40.
- Agren M S, Mirastschijski U, Karlsmark T, Saarialho-Kere U K. Topical synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases delays epidermal regeneration of human wounds. *Exp Dermatol* 2001; 10(5):337–48.
- Agren M S, Werthén M. The extracellular matrix in wound healing: a closer look at therapeutics for chronic wounds. *Int J Low Extrem Wounds* 2007; 6(2):82–97.
- Appleton I, Tomlinson A, Chander CL, Willoughby D A. Effect of endothelin-1 on croton oil-induced granulation tissue in the rat. A pharmacologic and immunohistochemical study. *Lab Invest* 1992; 67(6):703–10.
- Atkinson J C, Rühl M, Becker J, Ackermann R, Schuppan D. Collagen VI regulates normal and transformed mesenchymal cell proliferation in vitro. *Exp Cell Res* 1996; 228(2):283–91.
- Atkinson J J, Tonnies H M, Holmbeck K, Senior R M. Membrane type 1 matrix metalloproteinase is necessary for distal airway epithelial repair and keratinocyte growth factor receptor expression after acute injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293(3):600–10.
- Aumailley M, Specks U, Timpl R. Cell adhesion to type-VI collagen. *Biochem Soc Trans* 1991; 19(4):843–7.
- Aumüller G. *Duale Reihe Anatomie*. 1. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2007. Available at: URL:<http://www.worldcat.org/oclc/237117254>.

- Averbeck M, Gebhardt C A, Voigt S, Beilharz S, Anderegg U, Termeer C C, Sleeman J P, Simon J C. Differential regulation of hyaluronan metabolism in the epidermal and dermal compartments of human skin by UVB irradiation. *J Invest Dermatol* 2007; 127(3):687–97.
- Baenziger N L, Brodie G N, Majerus P W. A thrombin-sensitive protein of human platelet membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971; 68(1):240–3.
- Barbucci R, Bienvenuti M, Casolaro M, Lamponi S, Magnani A. Sulfated hyaluronic acid as heparin-like material: physicochemical and biological characterization. *J Mater Sci Mater Med* 1994; 5:830–33.
- Berger A, Hierner R. *Plastische Chirurgie Band I: Grundlagen Prinzipien Techniken*. Berlin Heidelberg: Springer; 2003. Available at: URL:<http://www.worldcat.org/oclc/863666918>.
- Bonaldo P, Russo V, Bucciotti F, Doliana R, Colombatti A. Structural and functional features of the alpha 3 chain indicate a bridging role for chicken collagen VI in connective tissues. *Biochemistry* 1990; 29(5):1245–54.
- Bornstein P. Diversity of function is inherent in matricellular proteins: an appraisal of thrombospondin 1. *J Cell Biol* 1995; 130(3):503–6.
- Bornstein P. Thrombospondins as matricellular modulators of cell function. *J Clin Invest* 2001; 107(8):929–34.
- Bretscher A. Regulation of cortical structure by the ezrin-radixin-moesin protein family. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11(1):109–16.
- Bretscher A. Microfilament organization in the cytoskeleton of the intestinal brush border. *Cell Muscle Motil* 1983; 4:239–68.
- Buckley C D, Pilling D, Lord J M, Akbar A N, Scheel-Toellner D, Salmon M. Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. *Trends Immunol* 2001; 22(4):199–204.
- Bullen E C, Longaker M T, Updike D L, Benton R, Ladin D, Hou Z, Howard E W. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 is decreased and activated gelatinases are increased in chronic wounds. *J Invest Dermatol* 1995; 104(2):236–40.

- Chen H, Herndon M E, Lawler J. The cell biology of thrombospondin-1. *Matrix Biol* 2000; 19(7):597–614.
- Chen W Y J, Abatangelo G. Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Repair Regen* 1999; 7(2):79–89.
- Chung E, Rhodes K, Miller E J. Isolation of three collagenous components of probable basement membrane origin from several tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 71(4):1167–74.
- Clark R A F. Cutaneous tissue repair: Basic biologic considerations. I. *J Am Acad Dermatol* 1985; 13(5):701–25.
- Clark R A F, Lin F, Greiling D, An J, Couchman J R. Fibroblast invasive migration into fibronectin/fibrin gels requires a previously uncharacterized dermatan sulfate-CD44 proteoglycan. *J Invest Dermatol* 2004; 122(2):266–77.
- Clark R A F, Ghosh K, Tonnesen M G. Tissue engineering for cutaneous wounds. *J Invest Dermatol* 2007; 127(5):1018–29.
- Coerper S, Schäffer M, Enderle M, Schott U, Köveker G, Becker H D. Die chirurgische Wundsprechstunde, Ein interdisziplinäres, diagnostisches und therapeutisches Konzept für chronische Wunden. *Der Chirurg* 1999; 70(4):480–84.
- Cohen I, Dingelmann R F, Lindblad F. Wound healing: biochemical and clinical aspects. Philadelphia: W.B. Saunders Co; 1992. Available at: URL:<http://www.worldcat.org/oclc/23690659>.
- Cooper D M, Yu E Z, Hennessey P, Ko F, Robson M C. Determination of endogenous cytokines in chronic wounds. *Ann Surg* 1994; 219(6):688–92.
- Cullen B, Smith R, McCulloch E, Silcock D, Morrison L. Mechanism of action of PROMOGRAN , a protease modulating matrix, for the treatment of diabetic foot ulcers. *Wound Repair Regen* 2002; 10(1):16–25.
- Cuono C, Langdon R, McGuire J. Use of cultured epidermal autografts and dermal allografts as skin replacements after burn injury. *Lancet* 1986; 1(8490):1123–4.
- Darby I, Skalli O, Gabbiani G. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest* 1990; 63(1):21–9.

- David-Raoudi M, Tranchepain F, Deschrevel B, Vincent J-C, Bogdanowicz P, Boumediene K, Pujol J-P. Differential effects of hyaluronan and its fragments on fibroblasts: relation to wound healing. *Wound Repair Regen* 2006; 16(2):274–87.
- Dieckmann C, Renner R, Milkova L, Simon J C. Regenerative medicine in dermatology: biomaterials, tissue engineering, stem cells, gene transfer and beyond. *Exp Dermatol* 2010; 19(8):697–706.
- Diegelmann R F. Excessive neutrophils characterize chronic pressure ulcers. *Wound Repair Regen* 2003; 11(6):490–5.
- Diegelmann R F, Evans M C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed wound healing. *Front Biosci* 2004; 9:283–9.
- Eckes B, Zweers M C, Zhang Z G, Hallinger R, Mauch C, Aumailley M, Krieg T. Mechanical tension and integrin $\alpha 2\beta 1$ regulate fibroblast functions. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2006; 11(1):66–72.
- Eckes B, Nischt R, Krieg T. Cell-matrix interactions in dermal repair and scarring. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2010; 3:4.
- Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(3):161–74.
- Ehrlich H P, Desmoulière A, Diegelmann R F, Cohen I K, Compton C C, Garner W L, Kapanci Y, Gabbiani G. Morphological and immunochemical differences between keloid and hypertrophic scar. *Am J Pathol* 1994; 145(1):105–113.
- Eming S A, Krieg T, Davidson J M. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol* 2007; 127(3):514–25.
- Esemuede N, Lee T, Pierre-Paul D, Sumpio B E, Gahtan V. The role of thrombospondin-1 in human disease. *J Surg Res* 2004; 122(1):135–42.
- Fette A. Integra artificial skin in use for full-thickness burn surgery: benefits or harms on patient outcome. *Technol Health Care* 2005; 13(6):463–8.
- Fleischmajer R, Perlish J S, Burgeson R E, Fisher L W. Dermal collagen fibrils are hybrids of type I and type III collagen molecules. *J Struct Biol* 1990; 105(1-3):162–9.

- Fritsch P. Dermatologie, Venerologie: Grundlagen, Klinik, Atlas. 2. Aufl. Berlin: Springer; 2004. Available at: URL:<http://www.worldcat.org/oclc/53098666>.
- Fujiwara M, Muragaki Y, Ooshima A. Keloid-derived fibroblasts show increased secretion of factors involved in collagen turnover and depend on matrix metalloproteinase for migration. *Br J Dermatol* 2005; 153(2):295–300.
- Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol* 2003; 200(4):500–3.
- Gabbiani G, Ryan G, Majno G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia* 1971; 27(5):549–50.
- Gama C I, Tully S E, Sotogaku N, Clark P M, Rawat M, Vaidehi N, Goddard W W 3rd, Nishi A, Hsieh-Wilson L C. Sulfation patterns of glycosaminoglycans encode molecular recognition and activity. *Nat Chem Biol* 2006; 2(9):467–73.
- Gandhi N S, Mancera R L. The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chem Biol Drug Des* 2008; 72(6):455–82.
- Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev* 2003; 55(12):1531–46.
- Gill S E, Parks W C. Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40(6-7):1334–47.
- Gillitzer R. Modernes Wundmanagement. *Der Hautarzt* 2002; 53(2):130–47.
- Granés F, Urena J M, Rocamora N, Vilaró S. Ezrin links syndecan-2 to the cytoskeleton. *J Cell Sci* 2000; 113:1267–76.
- Greiling D, Clark R A. Fibronectin provides a conduit for fibroblast transmigration from collagenous stroma into fibrin clot provisional matrix. *J Cell Sci* 1997; 110:861–70.
- Gressner A M, Arndt T. Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik Band 1 Klinische Chemie. Berlin Heidelberg: Springer; 2007. Available at: URL:<http://www.worldcat.org/oclc/812065404>.
- Grinnell F. Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. *J Cell Biol* 1994; 124(4):401–4.

- Guidry C, Hook M. Endothelins produced by endothelial cells promote collagen gel contraction by fibroblasts. *J Cell Biol* 1991; 115(3):873–80.
- Gurtner G C, Werner S, Barrandon Y, Longaker M T. Wound repair and regeneration. *Nature* 2008; 453(7193):314–21.
- Harding K G, Moore K, Phillips T J. Wound chronicity and fibroblast senescence--implications for treatment. *Int Wound J* 2005; 2(4):364–8.
- Hatamochi A, Aumailley M, Mauch C, Chu M L, Timpl R, Krieg T. Regulation of collagen VI expression in fibroblasts. Effects of cell density, cell-matrix interactions, and chemical transformation. *J Biol Chem* 1989; 264(6):3494–99.
- Herman I M. Actin isoforms. *Curr Opin Cell Biol* 1993; 5(1):48–55.
- Hintze V, Moeller S, Schnabelrauch M, Bierbaum S, Viola M, Worch H, Scharnweber D. Modifications of hyaluronan influence the interaction with human bone morphogenetic protein-4 (hBMP-4). *Biomacromolecules* 2009; 10(12):3290–7.
- Hintze V, Miron A, Moeller S, Schnabelrauch M, Wiesmann H P, Worch H, Scharnweber D. Sulfated hyaluronan and chondroitin sulfate derivatives interact differently with human transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1). *Acta Biomater* 2012; 8(6):2144–52.
- Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol* 2007; 127(3):526–37.
- Hiscox S, Jiang W G. Ezrin regulates cell-cell and cell-matrix adhesion, a possible role with E-cadherin/ β -catenin. *J Cell Sci* 1999; 112:3081–90.
- Holmbeck K, Bianco P, Yamada S, Birkedal-Hansen H. MT1-MMP: a tethered collagenase. *J Cell Physiol* 2004; 200(1):11–9.
- Howard E W, Crider B J, Updike D L, Bullen E C, Parks E E, Haaksma C J, Sherry D M, Tomasek J J. MMP-2 expression by fibroblasts is suppressed by the myofibroblast phenotype. *Exp Cell Res* 2012; 318(13):1542–53.
- Hynes R O. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* 2009; 326(5957):1216–19.
- Isnard N, Legeais J M, Renard G, Robert L. Effect of hyaluronan on MMP expression and activation. *Cell Biol Int* 2001; 25(8):735–9.

- Jackson D. The lymphatics revisited: new perspectives from the hyaluronan receptor LYVE-1. *Trends Cardiovasc Med* 2003; 13(1):1–7.
- Kadler K E, Baldock C, Bella J, Boot-Handford R P. Collagens at a glance. *J Cell Sci* 2007; 120:1955–8.
- Takehi K, Kinoshita M, Yasueda S. Hyaluronic acid: separation and biological implications. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003; 797(1-2):347–55.
- Keene D R, Engvall E, Glanville R W. Ultrastructure of type VI collagen in human skin and cartilage suggests an anchoring function for this filamentous network. *J Cell Biol* 1988; 107(5):1995–2006.
- Kirker K R, Luo Y, Nielson J H, Shelby J, Prestwich G D. Glycosaminoglycan hydrogel films as bio-interactive dressings for wound healing. *Biomaterials* 2002; 23(17):3661–71.
- Kirker K R, Luo Y, Morris S E, Shelby J, Prestwich G D. Glycosaminoglycan hydrogels as supplemental wound dressings for donor sites. *J Burn Care Rehabil* 2004; 25(3):276–86.
- Knupp C, Squire J M. A new twist in the collagen story--the type VI segmented supercoil. *EMBO J* 2001; 20(3):372–6.
- Kunze R, Rösler M, Möller S, Schnabelrauch M, Riemer T, Hempel U, Dieter P. Sulfated hyaluronan derivatives reduce the proliferation rate of primary rat calvarial osteoblasts. *Glycoconj J* 2010; 27(1):151–8.
- Ladin D A, Hou Z, Patel D, McPhail M, Olson J C, Saed G M, Fiverson D P. p53 and apoptosis alterations in keloids and keloid fibroblasts. *Wound Repair Regen* 1998; 6(1):28–37.
- Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1979; 227(5259):680–5.
- Langholz O, Röckel D, Mauch C, Kozłowska E, Bank I, Krieg T, Eckes B. Collagen and collagenase gene expression in three-dimensional collagen lattices are differentially regulated by $\alpha 1 \beta 1$ and $\alpha 2 \beta 1$ integrins. *J Cell Biol* 1995; 131:1903–15.

- Lawler J W, Slayter H S, Coligan J E. Isolation and characterization of a high molecular weight glycoprotein from human blood platelets. *J Biol Chem* 1978; 253(23):8609–16.
- Lee H, Overall C M, McCulloch C A, Sodek J. A critical role for the membrane-type 1 matrix metalloproteinase in collagen phagocytosis. *Mol Biol Cell* 2006; 17(11):4812–26.
- Lobmann R, Ambrosch A, Schultz G, Waldmann K, Schiweck S, Lehnert H. Expression of matrix-metalloproteinases and their inhibitors in the wounds of diabetic and non-diabetic patients. *Diabetologia* 2002; 45(7):1011–6.
- Machesney M, Tidman N, Waseem A, Kirby L, Leigh I. Activated keratinocytes in the epidermis of hypertrophic scars. *Am J Pathol* 1998; 152(5):1133–41.
- Madlener M, Parks W C, Werner S. Matrix metalloproteinases (MMPs) and their physiological inhibitors (TIMPs) are differentially expressed during excisional skin wound repair. *Exp Cell Res* 1998; 242(1):201–10.
- Von der Mark H, Aumailley M, Wick G, Fleischmajer R, Timpl R. Immunochemistry, genuine size and tissue localization of collagen VI. *Eur J Biochem* 1984; 142(3):493–502.
- Marston W A. Dermagraft, a bioengineered human dermal equivalent for the treatment of chronic nonhealing diabetic foot ulcer. *Expert Rev Med Devices* 2004; 1(1):21–31.
- Martin T A, Harrison G, Mansel R E, Jiang W G. The role of the CD44/ezrin complex in cancer metastasis. *Crit Rev Oncol Hematol* 2003; 46(2):165–86.
- Mast B A, Schultz G S. Interactions of cytokines, growth factors, and proteases in acute and chronic wounds. *Wound Repair Regen* 1996; 4(4):411–20.
- McKeown-Longo P, Hanning R, Mosher D. Binding and degradation of platelet thrombospondin by cultured fibroblasts. *J Cell Biol* 1984; 98(1):22–8.
- Menke N B, Ward K R, Witten T M, Bonchev D G, Diegelmann R F. Impaired wound healing. *Clin Dermatol* 2007; 25(1):19–25.

- Metcalf A D, Ferguson M W J. Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. *J R Soc Interface* 2007; 4(14):413–37.
- Mi H, Lazareva-Ulitsky B, Loo R, Kejariwal A, Vandergriff J, Rabkin S, Guo N, Muruganujan A, Doremioux O, Campbell M J, Kitano H, Thomas P D. The PANTHER database of protein families, subfamilies, functions and pathways. *Nucleic Acids Res* 2005; 33(Database issue):D284–8.
- Milstone L M, Hough-Nonroe L, Kugelman L C, Bender J R, Haggerty J G. Epican, a heparan/chondroitin sulfate proteoglycan form of CD44, mediates cell-cell adhesion. *J Cell Sci* 1994; 107:3183–90.
- Moll I. *Duale Reihe Dermatologie*. 7. vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2010. Available at: URL:<http://www.worldcat.org/title/oclc/633288473>.
- Mori H, Tomari T, Koshikawa N, Kajita M, Itoh Y, Sato H, Tojo H, Yana I, Seiki M. CD44 directs membrane-type 1 matrix metalloproteinase to lamellipodia by associating with its hemopexin-like domain. *EMBO J* 2002; 21(15):3949–59.
- Morra M. Engineering of biomaterials surfaces by hyaluronan. *Biomacromolecules* 2005; 6(3):1205–23.
- Morrison H, Sherman L S, Legg J, Banine F, Isacke C, Haipek C A, Gutmann D H, Ponta H, Herrlich P. The NF2 tumor suppressor gene product, merlin, mediates contact inhibition of growth through interactions with CD44. *Genes Dev* 2001; 15(8):968–80.
- Müller S, van der Smissen A, von Feilitzsch M, Anderegg U, Kalkhof S, von Bergen M. Quantitative proteomics reveals altered expression of extracellular matrix related proteins of human primary dermal fibroblasts in response to sulfated hyaluronan and collagen applied as artificial extracellular matrix. *J Mater Sci Mater Med* 2012; 23(12):3053–65.
- Nagase H. Cell surface activation of progelatinase A (proMMP-2) and cell migration. *Cell Res* 1998; 8(3):179–86.
- Nagase H, Woessner J F Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274(31):21491–4.

- Nehls V, Hayen W. Are hyaluronan receptors involved in three-dimensional cell migration? *Histol Histopathol* 2000; 15(2):629–36.
- Niezgoda J A, Van Gils C C, Frykberg R G, Hodde J P. Randomized clinical trial comparing OASIS Wound Matrix to Regranex Gel for diabetic ulcers. *Adv Skin Wound Care* 2005; 18:258–66.
- Niyibizi C, Eyre D R. Bone type V collagen: chain composition and location of a trypsin cleavage site. *Connect Tissue Res* 1989; 20(1-4):247–50.
- Nwomeh B C, Liang H X, Cohen I K, Yager D R. MMP-8 is the predominant collagenase in healing wounds and nonhealing ulcers. *J Surg Res* 1999; 81(2):189–95.
- Page-McCaw A, Ewald A, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(3):221–33.
- Parsonage G, Filer A D, Haworth O, Nash G B, Rainger G E, Salmon M, Buckley C D. A stromal address code defined by fibroblasts. *Trends Immunol* 2005; 26(3):150–6.
- Peyssonnaud C, Eychène A. The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biol Cell* 2001; 93(1-2):53–62.
- Pham C, Greenwood J, Cleland H, Woodruff P, Maddern G. Bioengineered skin substitutes for the management of burns: a systematic review. *Burns* 2007; 33(8):946–57.
- Pichert A, Samsonov S A, Theisgen S, Thomas L, Baumann L, Schiller J, Beck-Sickingher A G, Huster D, Pisabarro M T. Characterization of the interaction of interleukin-8 with hyaluronan, chondroitin sulfate, dermatan sulfate and their sulfated derivatives by spectroscopy and molecular modeling. *Glycobiology* 2012; 22(1):134–45.
- Pschyrembel klinisches Wörterbuch. 261 Aufl. Berlin, New York: Walter de Gruyter; 2007. Available at: URL:<http://www.worldcat.org/oclc/173251944>.
- Riede U, Werner M, Schaefer H. Allgemeine und spezielle Pathologie 5. komplett überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2004. Available at: URL:<http://www.worldcat.org/oclc/54880588>.

- Rodríguez D, Morrison C J, Overall C M. Matrix metalloproteinases: what do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1803(1):39–54.
- Saalbach A, Arnhold J, Lessig J, Simon J C, Anderegg U. Human Thy-1 induces secretion of matrix metalloproteinase-9 and CXCL8 from human neutrophils. *Eur J Immunol* 2008; 38(5):1391–403.
- Sabeh F, Ota I, Holmbeck K, Birkedal-Hansen H, Soloway P, Balbin M, Lopez-Otin C, Shapiro S, Inada M, Krane S, Allen E, Chung D, Weiss S J. Tumor cell traffic through the extracellular matrix is controlled by the membrane-anchored collagenase MT1-MMP. *J Cell Biol* 2004; 167(4):769–81.
- Sasisekharan R, Raman R, Prabhakar V. Glycomics approach to structure-function relationships of glycosaminoglycans. *Ann Rev Biomed Eng* 2006; 8:181–231.
- Sato H, Takino T, Miyamori H. Roles of membrane-type matrix metalloproteinase-1 in tumor invasion and metastasis. *Cancer Sci* 2005; 96(4):212–7.
- Sato H, Takino T, Okada Y. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. *Nature* 1994; 370(6484):61-5.
- Schnoor M, Cullen P, Lorkowski J, Stolle K, Robenek H, Troyer D, Rautenberg J, Lorkowski S. Production of type VI collagen by human macrophages: a new dimension in macrophage functional heterogeneity. *J Immunol* 2008; 180(8):5707–19.
- Schreml S, Szeimies R M, Prantl L, Karrer S, Landthaler M, Babilas P. Oxygen in acute and chronic wound healing. *Br J Dermatol* 2010; 163(2):257–68.
- Schultz G, Ladwig G, Wysocki A. Extracellular matrix: review of its role in acute and chronic wounds. *World Wide Wounds* 2005; Available at:
URL:<http://www.worldwidewounds.com/2005/august/Schultz/Extrace-Matric-Acute-Chronic-Wounds.html>
- Screaton G R, Bell M V, Jackson G, Cornelis F B, Gerth U, Bell J I. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(24):12160–4.
- Seltzer J L, Adams S A, Grant G A. Purification and properties of a gelatin-specific neutral protease from human skin. *J Biol Chem* 1981; 256(9):4662–8.

- Shephard P, Martin G, Smola-Hess S, Brunner G, Krieg T, Smola H. Myofibroblast differentiation is induced in keratinocyte-fibroblast co-cultures and is antagonistically regulated by endogenous transforming growth factor- β and interleukin-1. *Am J Pathol* 2004; 164(6):2055–66.
- Shi-Wen X, Chen Y, Denton C P, Eastwood M, Renzoni E A, Bou-Gharios G, Pearson J D, Dashwood M, du Bois R M, Black C M, Leask A, Abraham D J. Endothelin-1 promotes myofibroblast induction through the ETA receptor via a rac/phosphoinositide 3-Kinase/Akt-dependent pathway and is essential for the enhanced contractile phenotype of fibrotic fibroblasts. *Mol Biol Cell* 2004; 15(6):2707–19.
- Singer A J, Clark R A F. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999; 341(10):738–46.
- Skalli O, Pelte M F, Peclet M C, Gabbiani G, Gugliotta P, Bussolati G, Ravazzola M, Orci L. Alpha-smooth muscle actin, a differentiation marker of smooth muscle cells, is present in microfilamentous bundles of pericytes. *J Histochem Cytochem* 1989; 37(3):315–21.
- Slevin M, Krupinski J, Gaffney J, Matou S, West D, Delisser H, Savani R C, Kumar S. Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways. *Matrix Biol* 2007; 26(1):58–68.
- Van der Smissen A, Hintze V, Scharnweber D, Moeller S, Schnabelrauch M, Majok A, Simon J C, Anderegg U. Growth promoting substrates for human dermal fibroblasts provided by artificial extracellular matrices composed of collagen I and sulfated glycosaminoglycans. *Biomaterials* 2011; 32(34):8938–46.
- Sterry W. *Kurzlehrbuch Dermatologie*. 1. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2011. Available at: URL:<http://www.worldcat.org/oclc/706966750>.
- Streit M, Velasco P, Riccardi L, Spencer L, Brown L F, Janes L, Lange-Asschenfeldt B, Yano K, Hawighorst T, Iruela-Arispe L, Detmar M. Thrombospondin-1 suppresses wound healing and granulation tissue formation in the skin of transgenic mice. *EMBO J* 2000; 19(13):3272–82.

- Strongin A Y, Collier I, Bannikov G, Marmer B L, Grant G A, Goldberg G I. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem* 1995; 270(10):5331-8.
- Toole B P. Hyaluronan in morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2001; 12(2):79–87.
- Toole B P. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(7):528–39.
- Toriseva M, Kähäri V M. Proteinases in cutaneous wound healing. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66(2):203–24.
- Tredget E E, Nedelec B, Scott P G, Ghahary A. Hypertrophic scars, keloids, and contractures. The cellular and molecular basis for therapy. *Surg Clin North Am* 1997; 77(3):701–30.
- Underhill C. CD44: the hyaluronan receptor. *J Cell Sci* 1992; 103:293–8.
- Vacík J, Dvoránková B, Michálek J, Prádný M, Krumbholcová E, Fenclová T, Smetana K Jr. Cultivation of human keratinocytes without feeder cells on polymer carriers containing ethoxyethyl methacrylate: in vitro study. *J Mater Sci Mater Med* 2008; 19(2):883–8.
- Vedrenne N, Coulomb B, Danigo A, Bonté F, Desmoulière A. The complex dialogue between (myo)fibroblasts and the extracellular matrix during skin repair processes and ageing. *Pathol Biol (Paris)* 2012; 60(1):20–7.
- Wang F, Garza L A, Kang S, Varani J, Orringer J S, Fisher G J, Voorhees J J. In vivo stimulation of de novo collagen production caused by cross-linked hyaluronic acid dermal filler injections in photodamaged human skin. *Arch Dermatol* 2007; 143(2):155–63.
- Weigel P H, Frost S J, McGary C T, LeBoeuf R D. The role of hyaluronic acid in inflammation and wound healing. *Int J Tissue React* 1988; 10(6):355–65.
- Welch M P, Odland G F, Clark, R A. Temporal relationships of F-actin bundle formation, collagen and fibronectin matrix assembly, and fibronectin receptor expression to wound contraction. *J Cell Biol* 1990; 110(1):133–45.

- Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 2003; 83(3):835–70.
- Werner S, Krieg T, Smola H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol* 2007; 127(5):998–1008.
- West D, Pereira-Smith O M, Smith J R. Replicative senescence of human skin fibroblasts with a loss of regulation and overexpression of collagenase activity. *Exp Cell Res* 1989; 184(1):138–47.
- Williams D F. On the nature of biomaterials. *Biomaterials* 2009; 30(30):5897–909.
- Wipff P-J, Rifkin D B, Meister J J, Hinz B. Myofibroblast contraction activates latent TGF- β 1 from the extracellular matrix. *J Cell Biol* 2007; 179(6):1311–23.
- Wolny P M, Banerji S, Gounou C, Brisson A R, Day A J, Jackson D G, Richter R P. Analysis of CD44-hyaluronan interactions in an artificial membrane system: insights into the distinct binding properties of high and low molecular weight hyaluronan. *J Biol Chem* 2010; 285(39):30170–80.
- Wu Y, Wu M, He G, Zhang X, Li W, Gao Y, Li Z, Wang Z, Zhang C. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: a universal internal control for Western blots in prokaryotic and eukaryotic cells. *Anal Biochem* 2012; 423(1):15–22.
- Wu L, Derynck R. Essential role of TGF- β signaling in glucose-induced cell hypertrophy. *Dev Cell* 2009; 17(1):35–48.
- Yager D R, Zhang L Y, Liang H X, Diegelmann R F, Cohen I K. Wound fluids from human pressure ulcers contain elevated matrix metalloproteinase levels and activity compared to surgical wound fluids. *J Invest Dermatol* 1996; 107(5):743–8.
- Yager D R, Nwomeh B C. The proteolytic environment of chronic wounds. *Wound Repair Regen* 1999; 7(6):433–41.
- Yoneda M, Yamagata M, Suzuki S, Kimata K. Hyaluronic acid modulates proliferation of mouse dermal fibroblasts in culture. *J Cell Sci* 1988; 90:265–73.
- Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. Direct involvement of ezrin/radixin/moesin (ERM)-binding proteins in the organization of microvilli in collaboration with activated ERM proteins. *J Cell Biol* 1999; 145(7):1497–1509.

Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 2000; 14(2):163–76.

Zhong S P, Zhang Y Z, Lim C T. Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2010; 2(5):510–25.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abbildung 1:</i> Schematische Darstellung der Wundheilung	9
<i>Abbildung 2:</i> Subkonfluente Fb nach 5-tägiger Kultur auf den Matrices, bzw. Kontrollen	41
<i>Abbildung 3:</i> Unterlicht-Fotografie eines Elektrophorese-Gels.....	42
<i>Abbildung 4:</i> Vergleichbarkeit der Western Blot-Intensitäten von Parallelversuchen	44
<i>Abbildung 5:</i> Überprüfung der GAPDH als Referenz-Gen.....	45
<i>Abbildung 6:</i> Expression von MMP-2 durch die Fb nach der Kultur auf den Substraten, bzw. PS	47
<i>Abbildung 7:</i> Expression von MMP-14 durch die Fb nach der Kultur auf den Substraten, bzw. PS	48
<i>Abbildung 8:</i> Expression von Koll I durch die Fb nach der Kultur auf den Substraten, bzw. PS.....	49
<i>Abbildung 9:</i> Expression von Koll VI durch die Fb nach der Kultur auf den Substraten, bzw. PS.....	50
<i>Abbildung 10:</i> Expression von TSP-1 durch die Fb nach der Kultur auf den Substraten, bzw. PS.....	51
<i>Abbildung 11:</i> Expression von CD44 durch die Fb nach der Kultur auf den Substraten, bzw. PS	52
<i>Abbildung 12:</i> Expression von Ezrin durch die Fb nach der Kultur auf den Substraten, bzw. PS	53
<i>Abbildung 13:</i> Expression von α -SMA durch die Fb nach der Kultur auf den Substraten, bzw. PS	54
<i>Abbildung 14:</i> Darstellung aller GAPDH-Werte auf den Substraten, bzw. PS	58

TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 1:</i> Vergleich der Merkmale von hypertrophen Narben und Keloiden.....	16
<i>Tabelle 2:</i> Primäre Antikörper	28
<i>Tabelle 3:</i> Sekundäre Antikörper	29
<i>Tabelle 4:</i> Herstellung eines Trenn- und Sammelgels für die Zymographie	37
<i>Tabelle 5:</i> Darstellung des Molekulargewichts der mit Western Blot untersuchten Proteine in kDa.....	43

PUBLIKATION

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden im Rahmen der folgenden Publikation veröffentlicht:

Müller S, van der Smitten A, von Feilitzsch M, Anderegg U, Kalkhof S, von Bergen M.

Quantitative proteomics reveals altered expression of extracellular matrix related proteins of human primary dermal fibroblasts in response to sulfated hyaluronan and collagen applied as artificial extracellular matrix. *J Mater Sci Mater Med* 2012; 23(12):3053-65.